

УЧЕБНИКИ И УЧЕБНЫЕ ПОСОБИЯ
ДЛЯ СТУДЕНТОВ ВЫСШИХ УЧЕБНЫХ ЗАВЕДЕНИЙ

З.П.ПАУШЕВА

Практикум по цитологии растений

*Издание четвертое,
переработанное
и дополненное*

Допущено Управлением высшего и среднего специального образования Государственного агропромышленного комитета СССР в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений по специальности «Агрономия»

МОСКВА ВО «АГРОПРОМИЗДАТ» 1988



ББК 28.55

П21

УДК 581.17 (075.8)

Редактор *Е. В. Кирсанова*

Рецензенты: доктор сельскохозяйственных наук *А. З. Латылов*, доктор биологических наук *Е. В. Ивановская*.

Паушева З. П.

П21 Практикум по цитологии растений. — 4-е изд., перераб. и доп. — М.: Агропромиздат, 1988. — 271 с.: ил. (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений).

ISBN 5—10—000614—5

Книга содержит методики проведения исследований и практических работ по цитологии растений, многие из которых используют в клеточной биотехнологии. В четвертом издании (3-е вышло в 1980 г.) дополнены приемы дифференциального окрашивания хромосом, расширена методика флуоресцентной микроскопии, обновлены марки оптических приборов, даны методики изучения грибов, новые способы приготовления препаратов зародышевых мешков и др.

Для студентов высших учебных заведений по специальности «Агрономия».

П $\frac{2001020000-471}{035(01)-88}$ 228—89

ББК 28.55

ISBN 5—10—000614—5

© Издательство «Колос», 1980
© ВО «Агропромиздат», 1988
с изменениями

ПРЕДИСЛОВИЕ

В условиях научно-технического прогресса возросло значение цитологии, цитогенетики и эмбриологии в области генетики и селекции растений. Исследования клетки продолжают оставаться в центре внимания ученых. Интерес к цитологии — науке о клеточном уровне организации живой материи — вполне понятен. В исходной растительной клетке заложена наследственная информация, и от ее реализации зависит судьба будущего урожая. На знании цитологии построена клеточная инженерия растений — одно из важнейших звеньев современной биотехнологии.

Цель данного пособия — ознакомить студентов с важнейшими оптическими приборами, микрофотографией, измерением и зарисовкой объектов, приготовлением цитологических и эмбриологических препаратов, методами исследования клеточных структур, кариотипов, процессов митоза, мейоза, оплодотворения, перестроек хромосом, выявлением полиплоидов, мутантов, гаплоидов, апомиктов и т. д. Этим вопросам уделено особое внимание, так как селекционеру чаще всего приходится их решать при отборе исходного материала. Цитологический анализ в таких случаях позволяет ему целенаправленно вести дальнейшую работу.

Не зная цитологии, невозможно освоить и современную генетику — теоретическую основу селекции растений. Изучение строения хромосом, кариотипов, процессов митоза, мейоза и оплодотворения позволяет понять, как осуществляется преемственность в ряде поколений клеток и организмов.

Кроме того, чтобы со знанием дела выбрать для изучаемого объекта методики приготовления препаратов, соответствующие цели исследования, необходимо освоить все разнообразие приемов, находящихся сейчас на вооружении науки о клетке.

Автор выражает глубокую благодарность рецензентам 4-го издания практикума доктору биологических наук Е. В. Ивановской и доктору сельскохозяйственных наук А. З. Латыпову за ценные замечания, а также преподавателям вузов и научным сотрудникам за отзывы, которые были ранее опубликованы в печати.

ОБОРУДОВАНИЕ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В ЦИТОЛОГИИ

МИКРОСКОП И ОСНОВНЫЕ ПРИЕМЫ РАБОТЫ С НИМ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Изучать организмы растений и животных на клеточном уровне можно только при помощи микроскопической техники. Какой микроскоп выбрать для работы? Как им пользоваться? Какие к нему нужны принадлежности? Какой метод наблюдения следует применить, чтобы использовать оптический прибор наиболее целесообразно? Чтобы ответить на все эти вопросы, следует познакомиться с разнообразной микроскопической техникой и методами исследований.

Далеко не всякий микроскоп подходит для тонких исследований клетки и ее компонентов и не каждый метод наблюдения позволяет реализовать возможности, заложенные в конструкции данного оптического прибора. Распространено неверное представление о том, что качество микроскопа определяется его увеличением. Между тем увеличение — это только техническая характеристика прибора, не дающая точного представления о его качестве и назначении.

Для примера рассмотрим биологические микроскопы МБР-3 и МББ-1. Общее увеличение у первого составляет 2020, у второго — 1600. Может показаться, что первый микроскоп лучше. Однако один из них рабочий, а другой исследовательский, и они имеют существенные различия по качеству объективов.

Устройство микроскопа

Микроскоп — сложный оптический прибор, дающий увеличенное изображение мелких объектов и их деталей. В сравнении с простым увеличительным оптическим прибором, каким является лупа, микроскоп имеет значительные преимущества. Лупа имеет одну линзу, дает увеличенное, прямое и мнимое (т. е. лежащее по ту же сторону линзы, что и объект) изображение объекта. Объективы микроскопа — многолинзовые системы. Как мы увидим ниже, они свободны от аберраций, свойственных лупе, и имеют характерные особенности в построении изображения и выявлении деталей объекта. Микроскопы используют для визуальных наблюдений, фотографирования и точных коли-

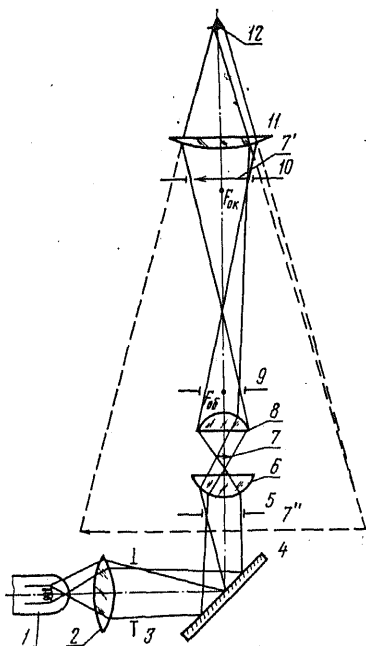


Рис. 1. Принципиальная схема устройства микроскопа и осветительной системы:
 1 — источник света; 2 — коллектор; 3 — левая диафрагма осветителя; 4 — зеркало; 5 — апертурная диафрагма конденсора; 6 — конденсор; 7 — препарат; 8 — объектив; 9 — выходной зрачок объектива; 10 — полевая диафрагма окуляра; 11 — окуляр; 12 — глаз.
 По И. Е. Скворцову с соавт.

чественных измерений. Хотя различные марки световых микроскопов имеют конструктивные отличия, в каждом из них существуют оптические и механические узлы. Принципиальная схема микроскопа и осветительной системы приведена на рисунке 1.

Осветительная система (конденсор и зеркало), объективы и окуляры вместе с тубусом составляют оптический узел, в котором все составные части строго центрированы по отношению друг к другу.

Конденсор расположен под столиком микроскопа и состоит из двух или трех линз. Различают несколько типов конденсоров в зависимости от метода наблюдения: конденсор светлого поля (рис. 2, А), конденсор темного поля (рис. 2, Б), конденсор для наблюдения по методу фазового контраста, конденсор с апертурной диафрагмой для косого освещения и др. Современные микроскопы снабжены апланатическим конденсором ОИ-14 для прямого и косого освещения. Для темного поля выпускают конденсор ОИ-13. Во время работы конденсор приводят в соответствующее положение, поднимая и опуская его специальным винтом. Под конденсором микроскопа находится *ирисовая диафрагма*.

Зеркало микроскопа имеет две поверхности — плоскую и вогнутую. Оно располагается под конденсором, направляя в него свет. Из конденсора пучок света попадает на препарат, находящийся на столике микроскопа, а затем входит в объектив. Таким образом, зеркало и конденсор предназначены для освещения препарата.

Объективы. Это наиболее важная составная часть оптического узла микроскопа. Современные объективы — многолинзовые системы, от качества которых в основном зависит изображение объекта. Недостатки линз могут привести к тому, что изображение объекта в какой-то степени окажется окрашенным

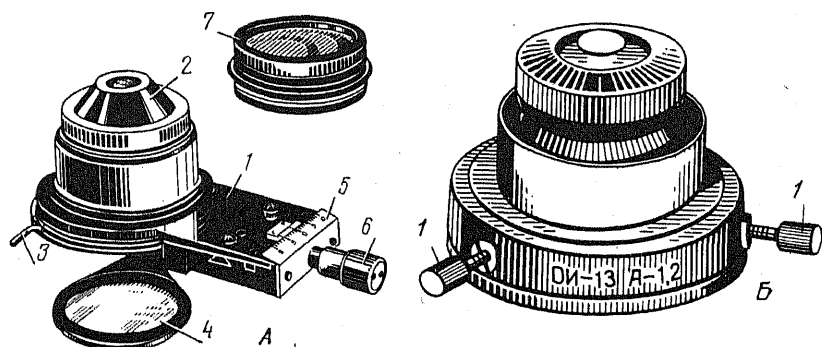


Рис. 2. Конденсоры:

ОП-14 — для прямого и косого освещения в проходящем свете (А): 1 — корпус; 2 — оправа для работы с объективами больших увеличений; 3 — рукоятка апертурной диафрагмы; 4 — откидное кольцо; 5 — шкала (на рисунке изображено нулевое ее положение для прямого освещения); 6 — рукоятка для смещения диафрагмы относительно оси при косом освещении; 7 — оправа с одиночной линзой для работы с объективом малого увеличения; ОП-13 (Б) темнопольный; 1 — центрировочные винты.

или размазанным, искривленным, т. е. возникнут аберрации. Различают следующие типы аберраций.

Сферическая аберрация, при которой изображение точки передается в виде кружка рассеяния. При наложении таких изображений друг на друга понижается контрастность. *Астигматизм* возникает, если изображение точки передается в виде кружка рассеяния, имеющего не круглую, а эллипсовидную форму. *Кома* — вид аберрации, при котором резкость изображения снижается от центра к границе поля зрения вследствие нарушения симметрии светового пучка. В изображении точки наблюдается односторонняя деформация. *Кривизна поля зрения* не позволяет одновременно видеть резко центр и края поля зрения. *Дисторсия* возникает, если нарушается подобие между объектом и его изображением из-за того, что линейное увеличение в центре и на краях поля зрения разное.

В зависимости от устранения рассмотренных выше аберраций различают оптику *анастигматическую* — свободную от астигматизма, *апланатическую* — без комы и сферической аберрации, *ортоскопическую* — без дисторсии.

Кроме указанных выше, существуют еще *хроматические аберрации*, при которых изображение, созданное зелеными лучами, не совпадает с созданным синими и красными. При этом различают *хроматизм положения*, когда изображения различных цветов располагаются на неодинаковом расстоянии от оптической системы, и *хроматизм увеличения*, когда изображения различных цветов, хотя и находятся в одной плоскости, но имеют неодинаковые размеры.

Знакомство с различными видами aberrаций показывает, что для получения качественного изображения, создаваемого объективом, необходимо максимально устранить недостатки оптической системы. В противном случае изображения объектов будут нерезкими, их форма и размеры будут значительно искажены или возникнут цветные окаймления (при хроматизме положения).

В зависимости от того, в какой степени они исправляют aberrации, различают объективы: ахроматы, апохроматы, планахроматы и планапохроматы. У объективов-ахроматов исправлены сферическая aberrация, кома и хроматизм положения для двух длин волн. Это наиболее простые системы, типичные для рабочих микроскопов (МБР-3, «Биолам»). Более сложной системой, в которой исправлены сферическая aberrация, кома, астигматизм, хроматизм положения для трех длин волн, обеспечивающие более высокое качество изображения, являются объективы-апохроматы (условное обозначение на корпусе — «АПО»). Их используют в работе совместно с компенсационными окулярами. Объективы-апохроматы входят в комплект исследовательских микроскопов МБИ-3, МББ-1, МБИ-11, МБИ-15 и некоторых моделей «Биолам».

У объективов ахроматов и апохроматов не устранена полностью кривизна изображения, при которой изображение оказывается размытым на краях поля зрения, что особенно неудобно при микрофотосъемке. Для устранения этого недостатка созданы объективы с плоским полем зрения — планахроматы и планапохроматы.

На оправе иммерсионных объективов имеются канавки разного цвета в зависимости от вида иммерсии. На объективе масляной иммерсии канавка окрашена в черный цвет, кроме того, на оправе стоит отметка «МИ». На объективе водной иммерсии канавка белая, а на оправе — отметка «ВИ». Вторым объективом удобен для изучения объектов, заключенных в воду, что позволяет работать без покровного стекла, например, в фитопатологии. На объективе глицериновой иммерсии канавка окрашена в желтый цвет.

Объектив дает геометрически подобное объекту увеличенное изображение с обратным расположением частей по отношению к препарату и в то же время выявляет подробности, недоступные глазу человека (или, как говорят, «разрешает» структуру). Обратное изображение заставляет наблюдателя передвигать объект при помощи препаратопроводителя в направлении, обратном кажущемуся: если нужно передвинуть изображение влево, то препарат необходимо переместить вправо, и наоборот.

Ограниченные размеры оптической системы микроскопа и то, что свет претерпевает дифракцию в неоднородной среде, —

одна из причин плохого изображения объектов. Вследствие дифракции света изображение точки представляет собой светлый круг, окруженный темными и светлыми полосами. Э. Аббе при разработке дифракционной теории изображения рассматривал структуру биологических объектов как особую дифракционную решетку и считал, что для четкого разрешения двух несамосветящихся точек, т. е. освещаемых извне прямым светом, можно воспользоваться формулой

$$d = \frac{\lambda}{A}, \quad (1)$$

где d — разрешающая способность объектива, мкм ($1 \text{ мкм} = 10^{-3} \text{ мм}$); λ — длина волны света, мкм; A — числовая апертура.

Этой формулой можно пользоваться как основной для вычисления разрешающей способности. При изучении самосветящихся объектов формула имеет следующий вид:

$$d = \frac{0,61\lambda}{A}. \quad (2)$$

Поскольку разрешающая способность зависит также от способа освещения препарата и контраста последнего, то реальная разрешающая способность ниже той, что получится при вычислении по формуле 2.

Числовая, или нумерическая, апертура (A) определяет способность оптической системы воспринимать то или иное количество света и определяется по формуле

$$A = n \cdot \sin \alpha, \quad (3)$$

где n — показатель преломления среды между фронтальной линзой объектива и покровным стеклом; α — половинный угол входного отверстия объектива (угол, одна сторона которого совпадает с оптической осью, другая образована линией, соединяющей точку выхода лучей из объекта с границей действующего отверстия объектива, рис. 3).

Поскольку показатель преломления воздуха равен 1, то A может изменяться у сухих объективов от 0 до 1. Если $\alpha = 90^\circ$, а $\sin 90^\circ = 1$, следовательно, $A = 1$, $\sin 40^\circ = 0,64$, $A = 0,64$. Чем больше угол α , тем выше апертура и тем лучше разрешающая способность объектива, т. е. он позволяет рассмотреть более мелкие детали. Качественные сухие объективы имеют A , равное 0,95. Наименьшая видимая структура при такой апертуре составляет 0,35 мкм. Иммерсионные объективы имеют более высокие значения A , чем сухие, так как показатель преломления жидкостей больше единицы. Например, вода имеет $n = 1,33$, кедровое масло — 1,515. Наиболее высокая апертура у масляно-иммерсионных объективов ($A = 1,4$). Числовую апертуру указывают на оправе объектива.

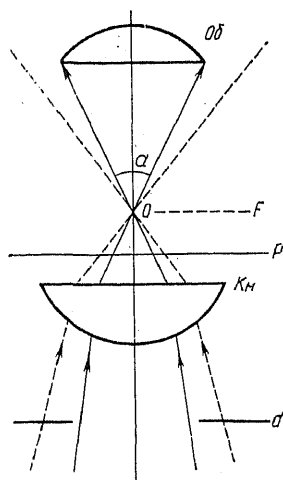


Рис. 3. Угол входного отверстия объектива (α):
 Об — объектив; OF — фокальная плоскость; P — препарат; Kn — конденсор; d — диафрагма конденсора.

Разрешающая способность объектива, т. е. способность его давать раздельное изображение точек объекта, расположенных близко друг к другу, зависит не только от апертуры, но и от длины волны света. При освещении обычным светом ($\lambda = 0,55$ мкм) и использовании объектива с апертурой 1,4 наименьший диаметр видимых частиц 0,24 мкм. Уменьшая длину волны света, можно увидеть более мелкие частицы и тем самым улучшить разрешающую способность объектива. Расчеты показывают, что при освещении синими лучами ($\lambda = 0,47$ мкм) можно увидеть частицы величиной 0,2 мкм. Для этого используют синие светофильтры.

Таким образом, разрешающая способность — одна из наиболее важных характеристик объектива. Ее часто определяют как величину наименьшего диаметра видимых частиц или наименьшее расстояние между двумя линиями, которые можно раздельно видеть в микроскоп. Эту характеристику микроскопа можно улучшить путем увеличения числовой апертуры объектива и уменьшения длины волны света.

Конденсор микроскопа также имеет определенную числовую апертуру: 1,2; 1,4. Высокоапертурные объективы сочетают при работе с высокоапертурными конденсорами. Если апертура конденсора меньше апертуры объектива, то возможности объектива реализуются не полностью.

В связи с этим во время работы с микроскопом необходимо добиваться, чтобы апертуры объектива и конденсора соответствовали друг другу (см. с. 22).

Видимое исследователем изображение препарата зависит от оптической системы микроскопа и зрительного восприятия. Глаз человека также обладает определенной разрешающей способностью, или остротой зрения. Невооруженный глаз различает детали величиной не более 0,15 мм. На разрешающую способность глаза влияет освещенность объекта — с ее уменьшением острота зрения снижается. Кроме того, имеют значение его контрастность и цвет. Спектральная чувствительность глаза лежит в диапазоне световых волн длиной 380—770 нм, но наибольшая она при монохроматическом излучении с длиной волны 555 нм (1 нм = 10^{-6} мм, 1 мкм = 1000 нм).

Диаметр зрачка изменяется от 1,5 до 8 мм в зависимости от яркости объекта. Хотя нормальный глаз может длительное время наблюдать объекты на расстоянии от бесконечно большого до 250 мм, но именно 250 мм принято считать *расстоянием наилучшего видения*. Процесс наблюдения связан с такой особенностью глаза, как аккомодация, т. е. возможность приспосабливаться четко видеть объект на определенном расстоянии. Таким образом, разрешающей способностью обладают объектив, конденсор и глаз человека.

Кроме разрешающей способности, объектив характеризуется определенным *фокусным расстоянием* и *увеличением*. Слабые объективы имеют большое фокусное расстояние — 50—60 мм, а сильные — 1—3 мм, т. е. чем больше фокусное расстояние, тем меньше увеличение объектива.

Увеличение объектива указано на оправе. Например, у микроскопа объективы имеют увеличение 9×, 40×, 90× и апертуру соответственно 0,20; 0,65 и 1,25.

Каждый объектив характеризуется определенной *величиной рабочего расстояния* в миллиметрах. Объективы с малым увеличением имеют расстояние от объектива до препарата во много раз больше, чем объективы с большим увеличением. Поэтому во время фокусировки микроскопа необходимо пользоваться только той рукояткой, которая соответствует данному объективу, чтобы не раздавить препарат и не испортить объектив. Так, объективы микроскопа с увеличениями 9×, 40× и 90× имеют рабочие расстояния соответственно 13,8; 0,6 и 0,12 мм. Объектив малого увеличения отличается не только максимальным рабочим расстоянием, но и большим полем зрения, поэтому исследование препарата всегда начинают с него.

При работе с микроскопом важное значение имеет толщина покровного и предметного стекол. Даже небольшое отклонение от нормальной толщины (0,17 мм — для покровного и 1,2 мм — для предметного) сказывается на качестве изображения сильных объективов.

Помимо перечисленных характеристик, объективы отличаются разнообразием в зависимости от длины тубуса, среды между фронтальной линзой и препаратом, метода наблюдения и т. д. Так, они могут быть рассчитаны на длину тубуса 160 мм — для проходящего света, 190 мм — для отраженного, бесконечность — для проходящего или отраженного. Объективы бывают сухие и иммерсионные. Для наблюдений методом фазового контраста существуют фазово-контрастные объективы, а для изучения непрозрачных объектов в отраженном свете — эпиобъективы. Определенные объективы применяют только в тех условиях, для которых они предназначены. Если придется работать с покровными стеклами, имеющими толщину больше или меньше 0,17 мм, то лучше пользоваться микроско-

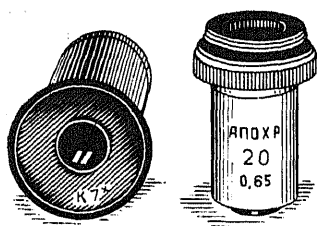


Рис. 4. Компенсационный окуляр 7× и объектив-апохромат 20× (справа).

пом, в комплект которого входит *объектив с коррекционной оправой*, позволяющий исправить сферическую aberrацию, вносимую покровным стеклом.

Окуляр устроен значительно проще объектива. Нередко он состоит всего из двух линз. По назначению его можно сравнить с лупой: с его помощью получают мнимое увеличенное изображение, но он не способствует выявлению подробностей строения.

Таким образом, объектив и окуляр в комплексе дают *мнимое, дважды увеличенное и обратное по отношению к препарату изображение*.

Различные типы окуляров неодинаково исправляют остаточные aberrации объективов, и выбор их зависит от типа объектива. Так, окуляры Гюйгенса и ортоскопические окуляры предназначены для работы с ахроматами малых и средних увеличений и планахроматами малых увеличений. Компенсационные окуляры используют в работе с разными апохроматами, планахроматами и ахроматами больших увеличений. На их корпусе стоит буква К и указано увеличение (рис. 4). Гомали, входящие в комплект микрофотонасадок, исправляют кривизну изображения. Их применяют только при фотографировании в видимой области спектра. Эти окуляры не подходят для работы с объективами-планахроматами.

Увеличение окуляров у микроскопа обычно составляет 7×, 10×, 15×, а линейное поле зрения — соответственно 18, 14 и 8 мм. Общее увеличение микроскопа определяют как произведение увеличения объектива ($V_{об}$) на увеличение окуляра ($V_{ок}$):

$$V = V_{об} \cdot V_{ок}. \quad (4)$$

Если объектив имеет увеличение 90×, а окуляр 15×, то общее увеличение равно 1350. В тех случаях, когда микроскоп снабжен бинокулярной насадкой АУ-12, имеющей свое собственное увеличение ($V_{н}$), равное 1,5×, увеличение микроскопа определяют по формуле

$$V = V_{об} \cdot V_{ок} \cdot V_{н}. \quad (5)$$

Разрешающая способность микроскопа реализуется только при определенном *увеличении*, которое называется *полезным* и определяется так:

$$V_{полезное} = (500 \div 1000) A. \quad (6)$$

Расчеты показывают, что полезное увеличение не может превышать 1300—1500 раз. Большее увеличение не выявляет

новых деталей на изображении, а освещенность его уменьшается.

Окуляр с нужным увеличением выбирают в зависимости от объектива и величины полезного увеличения следующим образом. Допустим, имеется объектив с увеличением $90\times$ и апертурой 1,35. Полезное увеличение составляет $1000 \cdot 1,35 = 1350$ раз. Разделив 1350 на 90, находят величину максимального увеличения окуляра — $15\times$. Использование более сильных окуляров в данном случае отрицательно скажется на качестве изображения вследствие явления дифракции света.

От увеличения микроскопа (V) и апертуры объектива (A) зависит *глубина резкости* изображения (T). Каждый объектив позволяет видеть препарат на определенную глубину в одной плоскости. При изучении препарата под микроскопом приходится поочередно фокусировать объектив в разных плоскостях, чтобы изучить препарат на разной глубине. Таким образом, глубина резкости изображения — это глубина препарата (в мкм), видимая одновременно резко. Ее определяют по формуле

$$T = \frac{1000}{7AV} + \frac{\lambda}{2A^2}. \quad (7)$$

При увеличении 1350, апертуре 1,3, длине волны (λ) 0,55 мкм глубина резкости изображения составляет 0,24 мкм. При небольших увеличениях и малой апертуре глубина резкости больше, чем при больших увеличениях и высокой апертуре.

Объектив и окуляр микроскопа крепятся на тубусе, в большинстве случаев наклонном. Нормальная длина тубуса составляет 160 мм. Для микрофотографии наклонный тубус заменяют вертикальным.

Механический узел микроскопа состоит из штатива, на котором крепятся оптические детали, предметного столика и механизмов для фокусировки микроскопа. Грубую и точную фокусировку осуществляют разными рукоятками. Особенно осторожно приходится устанавливать точную фокусировку объективов со средним и большим увеличением, которые имеют, как указывалось выше, небольшие рабочие расстояния.

Виды микроскопов, используемых при изучении биологических объектов

Промышленность выпускает много моделей световых и электронных микроскопов, предназначенных для изучения различных объектов. Среди световых микроскопов различают биологические, которые применяют для изучения микроскопических объектов в биологии, медицине, сельском хозяйстве, и металло-

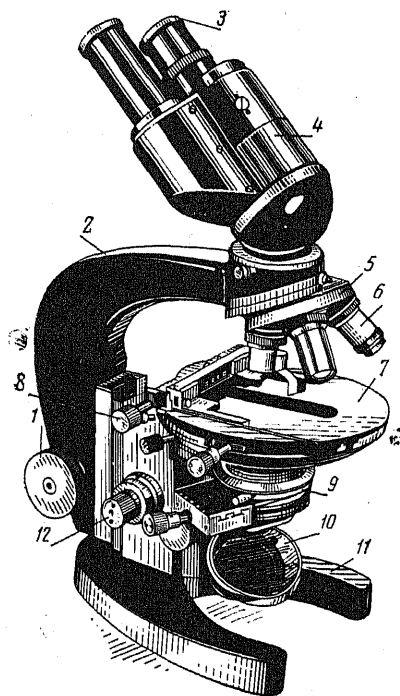


Рис. 5. Микроскоп МБР-3:

1 — рукоятка грубой фокусировки; 2 — тубус-содержатель; 3 — окуляр; 4 — бинокулярный тубус; 5 — револьвер; 6 — объектив; 7 — предметный столик; 8 — препаратодоводитель; 9 — конденсор; 10 — зеркало; 11 — основание штатива; 12 — рукоятка точной фокусировки.

графические, используемые в промышленности. Биологические микроскопы разнообразны. Условно их делят на упрощенные, рабочие, исследовательские и универсальные.

Для всестороннего изучения объекта и в зависимости от метода наблюдения исследователь не ограничивается биологическими микроскопами (МБ), а применяет стереоскопические (МБС, МССО), поляризационные (Полам), люминесцентные (ЛЮАМ), ультрафиолетовые (МУФ), инфракрасные (МИК), электронные (ЭМ) и другие. При передаче изображения на расстоянии пользуются телевизион-

ным микроскопом, у которого оптическое изображение преобразуется в серию электронных сигналов. Для учебных целей и повседневной работы в лабораториях более всего подходят модели рабочих биологических микроскопов МБР-3, «Биолам Р», «Биолам С».

МБР-3 еще часто встречается в лабораториях, однако взамен его промышленность выпускает новые модели серии «Биолам». Этот микроскоп (рис. 5) представляет собой большую модель рабочего биологического микроскопа. Он позволяет изучать прозрачные объекты в проходящем свете при прямом и косом освещении и в поляризованном свете. В комплект микроскопа входят: планхроматический объектив с увеличением $9\times$, апертурой 0,2; ахроматический с увеличением $40\times$, апертурой 0,65; ахроматический масляной иммерсии с увеличением $90\times$, апертурой 1,25 и окуляры Гюйгенса с увеличением $7\times$, $10\times$. Модель имеет удобный препаратодоводитель, бинокулярный тубус с увеличением $1,5\times$, позволяющий устанавливать окуляры соответственно расстоянию между глазами, и монокулярный тубус для фотографирования.

Микроскопы серии «Биолам» бывают трех типов: рабочие («Биолам Р»), студенческие («Биолам С»), дорожные («Био-

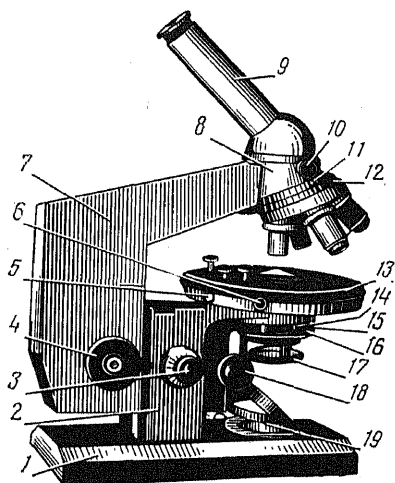


Рис. 6. Микроскоп «Биолам Р»:

1 — основание; 2 — коробка с механизмом микрометрической фокусировки; 3 — рукоятка микрометрической фокусировки; 4 — рукоятка макрометрической фокусировки; 5 — стопорный винт; 6 — центрировочный винт; 7 — тубусодержатель; 8 — головка; 9 — монокулярная насадка; 10 — винт насадки; 11 — винт револьвера; 12 — револьвер; 13 — предметный столик; 14 — винт конденсора; 15—16 — корпус конденсора; 17 — откидная линза в оправе; 18 — рукоятка конденсора; 19 — зеркало.

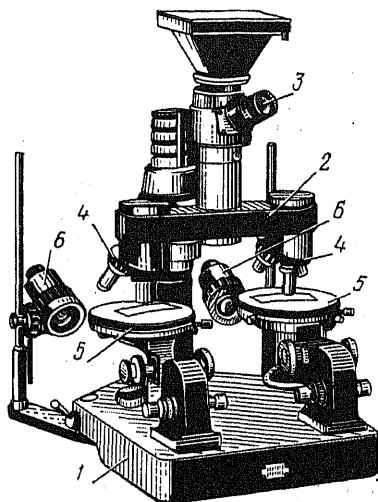


Рис. 7. Микроскоп сравнения MC-51:

1 — основание; 2 — кронштейн с тубусом; 3 — микрофотонасадка с визирной трубкой; 4 — револьверы с объективами; 5 — предметные столики; 6 — осветители. По Л. А. Федину.

лам Д»). Отличаются они по комплектам предметных столиков, визуальных насадок, наборам объективов и окуляров, осветительных устройств и др.

Микроскоп «Биолам Р» выпускают в семи (Р11—Р17) вариантах. «Биолам Р» показан на рисунке 6. Основание этого микроскопа прямоугольное, тубусодержатель современной формы — наклонный конденсор КОН-3 имеет дополнительную откидную линзу для работы с объективами малых увеличений. В комплект микроскопа входят три ахроматических объектива — 8 \times , 40 \times , 90 \times и окуляры К7 \times , К15 \times . К моделям «Биолам Р14» и «Биолам Р16» прилагаются осветители ОИ-35, а к моделям «Биолам Р13» и «Биолам Р17» — бинокулярные насадки АУ-12.

У «Биолама Р17» есть круглый вращаемый столик с координатным перемещением препарата, две шкалы которого позволяют найти на препарате необходимые детали и записать их положение. Конденсор микроскопа — тоже вращаемый (ОИ-14). Объективы апохроматические с увеличением и апертурой соответственно 10 \times — 0,3, 20 \times — 0,65, 60 \times — 1,07 и

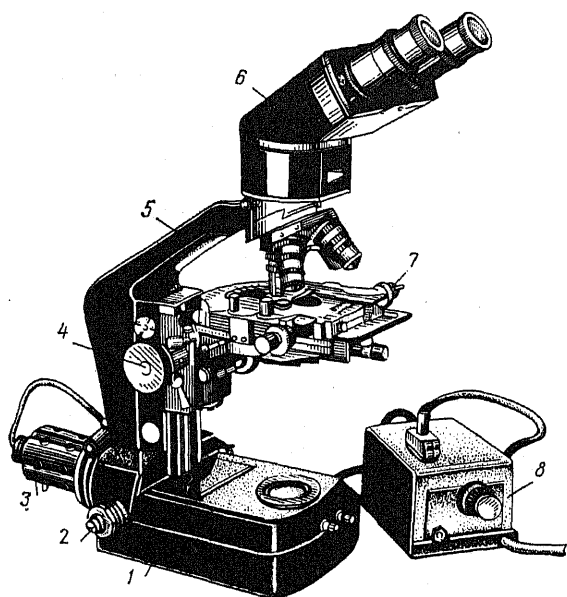


Рис. 8. Микроскоп МББ-1:

1 — основание; 2 — рукоятка точной фокусировки; 3 — осветитель; 4 — рукоятка грубой фокусировки; 5 — тубусодержатель; 6 — бинокулярная насадка; 7 — рукоятка препаратодержателя; 8 — трансформатор.

90 \times — 1,3. Окуляры компенсационные с увеличением от 5 до 20 раз. Окуляры 15 \times и 20 \times применяются с монокулярным тубусом. В комплект входит измерительный окуляр со шкалой и сеткой.

Для сравнительного изучения в поле зрения одновременно двух препара-

тов используют микроскоп сравнения МС-51 (рис. 7). Он состоит из двух рабочих микроскопов, каждый из которых имеет свой осветитель. В этом микроскопе окуляр с разделенным полем зрения. Осветители позволяют вести наблюдение как в проходящем, так и в отраженном свете. Кроме того, микроскоп снабжен микрофотонасадкой.

Для работы в научно-исследовательских лабораториях используют микроскопы с более совершенной оптикой, чем у рабочих. Большой биологический микроскоп МББ-1 (рис. 8) в отличие от рассмотренных выше моделей микроскопической техники имеет встроенный осветитель, обеспечивающий постоянное освещение во время исследовательских работ в проходящем свете при прямом и косом освещении. Бинокулярная насадка АУ-26 позволяет получать три степени увеличения. К микроскопу прилагается: восемь объективов — один планхроматический, шесть апохроматических и один ахроматический; три компенсационных окуляра и большой набор вспомогательных принадлежностей — темнопольный конденсор, фазово-контрастное устройство КФ-4, поляризаторы и т. д.

Широкие возможности для разнообразной работы имеет универсальный исследовательский биологический микроскоп МБИ-15, который выпускается в четырех вариантах. Один из них с полным комплектом позволяет вести наблюдения на светлом и темном поле, методом фазового контраста и в поляризованном свете. Он снабжен ртутно-кварцевой лампой — для

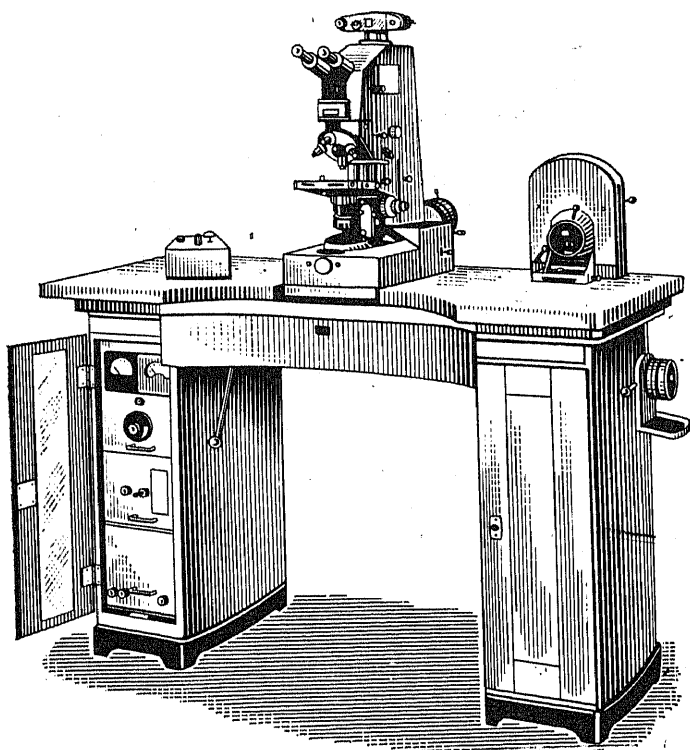


Рис. 9. Микроскоп МБИ-15.

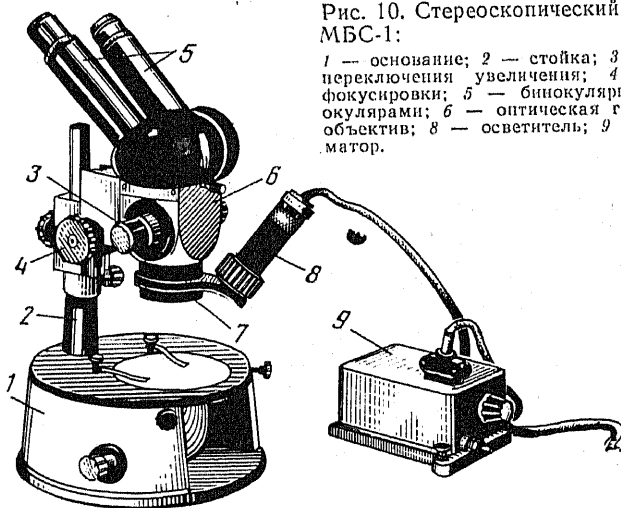


Рис. 10. Стереоскопический микроскоп МБС-1:

1 — основание; 2 — стойка; 3 — рукоятка переключения увеличения; 4 — рукоятка фокусировки; 5 — бинокулярный тубус с окулярами; 6 — оптическая головка; 7 — объектив; 8 — осветитель; 9 — трансформатор.

наблюдения люминесцентным методом, автоматическим экспонометром — для микрофотографии и пленочной фотокамерой (рис. 9).

Помимо рассмотренных выше, в лабораториях необходимы стереоскопические микроскопы. Они дают прямое и объемное изображения объекта (рис. 10). При помощи таких микроскопов, имеющих небольшое увеличение, удобно рассматривать бинокулярным способом (обоими глазами) мелкие объекты и выполнять препаровальные работы. Стереоскопические микроскопы строят изображения по схеме Грену. Объемное изображение объекта достигается за счет двух оптических систем, расположенных под углом друг к другу. В лабораториях распространены стереоскопические микроскопы МБС-1 и МБС-2. Выпускают и новые модели с более совершенной оптикой — МБС-9, МССО.

Для изучения биологических объектов выпускают также микроскопы специального назначения: поляризационные, люминесцентные, ультрафиолетовые, интерференционные, электронные и др. (см. с. 45—50).

Вспомогательные принадлежности к микроскопам

Не всякий микроскоп укомплектован всем необходимым. Поэтому нередко нужно приобретать различные устройства, принадлежности и вспомогательные средства к биологическому микроскопу, которые расширяют возможности исследования. Важнейшие из них следующие.

Препаратоводитель. Он не входит в комплект некоторых микроскопов «Биолам». Для биологического рабочего микроскопа удобен препаратоводитель СТ-12, служащий для перемещения препарата в двух взаимно перпендикулярных направлениях. К нему прилагается центрировочная пластинка.

Осветитель. Для биологических микроскопов хорошими осветителями считают ОИ-19 и ОИ-9м (рис. 11), смонтированные на штативе. Во время работы их устанавливают перед микроскопом. Осветители ОИ-25, ОИ-32 и ОИ-35 размещают под конденсором, для этого зеркало снимают. Они предназначены для работы в проходящем свете. Для освещения объектов при фотографировании используют осветитель ОИ-24.

Бинокулярная насадка АУ-12 с увеличением 1,5 \times служит для наблюдения объектов обоими глазами.

Объект-микрометр и **окуляр-микрометр** предназначены для измерений под микроскопом. При работе в проходящем свете используют объект-микрометр ОМП, в отраженном свете — ОМО.

Рисовальный аппарат. Он необходим для зарисовки изображения объекта с препарата. Наиболее распространен

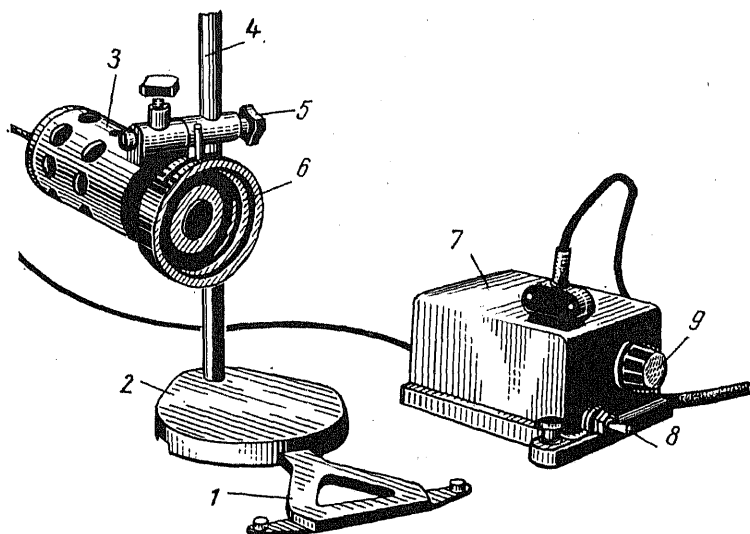


Рис. 11. Осветитель ОИ-9м с трансформатором:

1 — планка для соединения с микроскопом; 2 — основание осветителя; 3 — корпус; 4 — стойка; 5 — зажимное устройство; 6 — ирисовая диафрагма; 7 — трансформатор; 8 — тумблер для включения лампы осветителя; 9 — реостат для регулирования накала лампы.

РА-4 (см. рис. 14). Выпускают новые модели — РА-6. РА-7.

Микроманипулятор ММ-1. Он предназначен для препарирования объектов, осуществления тонких операций на клетке и различных воздействий на нее.

Приборы для микрофотосъемки не входят в комплекты «Биолам». Они необходимы для того, чтобы документировать результаты исследований. С биологическими микроскопами можно использовать микрофотонасадки МФН-1, МФН-2, МФН-7, МФН-3, МФН-12, из которых первые три дают возможность делать снимки на фотопластинки, а две другие — на фотопленку. Микрофотонасадка МФНЭ-1 снабжена автоматическим экспонетром. Микрофотонасадку МФН-5 используют при работе со стереоскопическими микроскопами МБС-1 и МБС-2, МБС-9. Прибор для микрофотосъемки ФМН-3 состоит из осветителя и фотокамеры, смонтированных на одном основании, он удобен при работе с микроскопами. В его комплект входят три типа гомалей и пять светофильтров. В отличие от этого прибора ФМН-2 предназначен для микро- и макрофотосъемки.

Микропроектор позволяет демонстрировать препараты во время лекции, фотографировать и зарисовывать детали препарата на бумаге.

Микрокиноустановка МКУ-4 служит для киносьеми различных процессов через микроскоп.

Светофильтры необходимы для визуального наблюдения и во время микрофотографирования.

Предметные стекла должны иметь толщину 1—1,2 мм и плоскопараллельные поверхности без царапин.

Иммерсионные жидкости: кедровое масло (показатель преломления $n=1,51$), водный раствор глицерина (74% глицерина и 26% воды; $n=1,43$), вазелин ($n=1,5$), монобромнафталин ($n=1,66$), а также вода ($n=1,33$). Кедровое масло чаще всего используют в работе. При исследованиях в отраженном свете применяют монобромнафталин, в ультрафиолетовой микроскопии — вазелиновое масло. Глицериновая и водная иммерсии предназначены для работы с обычными и ультрафиолетовыми микроскопами.

РАБОТА С МИКРОСКОПОМ

Общие замечания

Существует целый ряд важных моментов, которые необходимо учитывать, приступая к работе с микроскопом. Вот некоторые из них.

1. Микроскопы предпочтительно размещать в комнате с окнами, выходящими на северную сторону, чтобы можно было использовать естественный рассеянный свет в дневное время, избегая попадания в микроскоп прямых солнечных лучей, которые мешают наблюдателю. Если пользуются осветителем, выбирают место подальше от прямого солнечного света, в более темной части лаборатории. Лучше иметь стол с темной поверхностью. Все это способствует более спокойной работе глаз. Высота стола и стула должна быть такой, чтобы наблюдатель, сидя прямо и вплотную к столу, не чувствовал напряжения.

2. Перед началом работы удаляют пыль с микроскопа мягкой кисточкой или чистой тряпочкой, затем ставят его на стол так, чтобы окуляр находился против левого глаза наблюдателя — для монокулярного тубуса. Окулярные трубки бинокулярной насадки должны быть против глаз. При этом необходимо проверить, одинаково ли увеличение в трубках окуляров. Разворотом тубусов окулярные трубки устанавливают в соответствии с расстоянием между глазами так, чтобы поля двух трубок слились в одно. Насадка АУ-12 имеет увеличение $1,5\times$, что необходимо учесть при определении общего увеличения микроскопа. Полезно ознакомиться с устройством нового микроскопа по описанию.

3. Направо от микроскопа на столе располагают необходимые реактивы, инструмент, предметные и покровные стекла, журнал для записи и рисовальный столик с бумагой.

4. Переносить микроскоп можно только двумя руками. Для этого одной рукой берутся за изгиб тубусодержателя, а другой поддерживают основание штатива.

5. Микроскоп следует предохранять от сырости, толчков, царапин и контакта с кислотами, щелочами, растворителями, применяемыми особенно часто в гистохимии и при изготовлении временных препаратов.

6. Не следует вынимать из тубуса окуляр, чтобы не загрязнять пылью тубус и объектив.

7. Во время перерывов в работе с микроскопом осветитель выключают. Это позволяет предохранить лампочку накаливания от быстрого перегорания.

8. По окончании всей работы объективы ставят в нерабочее положение, препараты снимают со столика, микроскоп протирают и накрывают чехлом или убирают в футляр.

Установка освещения

Во время изучения препаратов при помощи микроскопической техники огромное значение имеет источник света. Удобнее всего пользоваться искусственным источником света, который отличается от дневного большей стабильностью и дает возможность добиться наилучшей освещенности при работе с сильными объективами. Нить лампы осветителя обеспечивает гораздо более яркое освещение, чем обычный свет.

К источнику света предъявляют ряд требований, из которых самые важные: яркость, форма, размеры светящегося тела, световая отдача, срок службы, наличие коллектора (собираательной линзы для сужения светового потока) и трансформатора. Изменение напряжения в сети всего на 1% снижает срок службы ламп на 13%. Наибольшей яркостью обладают источники света со светящимся телом небольшого размера.

При подборе ламп необходимо учитывать, что в самой оптической системе микроскопа происходят потери света из-за рассеяния, поглощения и отражения, причем пыль на линзах усиливает рассеяние. Потери света, по некоторым расчетам, могут составить до $\frac{1}{3}$ потока излучения. Все это ухудшает качество изображения.

Современные осветители (ОИ-19, ОИ-9м) имеют электрическую лампочку, заключенную в светонепроницаемый кожух, коллектор (повышает выход света), диафрагму поля зрения и светофильтры. Для удобства осветитель крепят на штативе и снабжают металлической планкой, при помощи которой его располагают на определенном расстоянии от зеркала микроскопа. Правильно налаженное освещение дает возможность наиболее полно использовать разрешающую способность микроскопа и получить хорошее качество изображения (рис. 12).

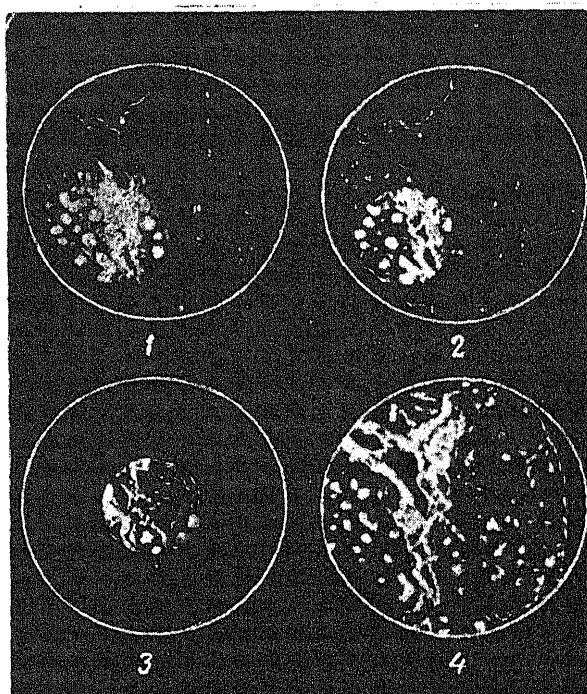


Рис. 12. Установка освещения. По Г. Аппельту.

При установке освещения не нужно стремиться к тому, чтобы освещать объект с избытком, так как лишний свет не участвует в построении изображения, но снижает его контрастность за счет рассеяния и других причин. Конденсор выполняет очень важную функцию — увеличивает изображение источника света для заполнения световым потоком апертуры объектива. Исследователь должен так установить осветитель, чтобы коллектор передал изображение источника света на апертурную диафрагму, всю ее заполнив светом. Если это условие не выполнено, возможности микроскопа реализуются не полностью.

Наиболее равномерное освещение поля зрения под микроскопом с минимальным рассеянием достигается при установке света по *принципу Кёлера*, т. е. так, чтобы апертуры объектива и конденсора соответствовали друг другу. Рационального освещения объекта легко достигнуть, работая с осветителями ОИ-19 и ОИ-9м. Они обеспечивают равные апертуры коллектора осветителя, конденсора и объектива. Так, для объективов больших увеличений (20 \times и более) подбирают конденсор

с апертурой 1,4, для объективов малых увеличений — конденсор с апертурой 0,3. В конденсоре осветителя ОИ-14 для работы с объективом малого увеличения есть специальная очковая линза с апертурой 0,3, которая ввинчивается в верхнюю часть конденсора после удаления оправы. Если не заменить конденсор с апертурой 1,4 на конденсор 0,3, то при установке света не удастся осветить все поле зрения при малом увеличении (например, с осветителем ОИ-19).

Чтобы равномерно осветить поле зрения микроскопа, добиться минимального рассеяния света, правильно заполнить светом апертуру объектива, выполняют следующие правила.

1. На расстоянии 250 мм перед микроскопом (Биолам Р, МБР-3) устанавливают осветитель (ОИ-19, ОИ-9м) при помощи соединительной планки. Удаляют матовое стекло под конденсором, а сам конденсор ставят в верхнее положение на уровне столика микроскопа. В конденсоре ОИ-14 необходимо совместить индекс шкалы с нулевым делением. Осветитель соединяют с трансформатором, который включают в сеть. Световой поток от осветителя направляют на плоское зеркало. Добиваются четкого изображения нити накала источника света на закрытой диафрагме конденсора путем перемещения патрона лампочки вдоль оси. При этом необходимо удалить матовое стекло из осветителя и закрыть его диафрагму, иначе трудно получить четкое изображение нитей лампы (во время этой операции на зеркало помещают кружок белой бумаги). После того как нить лампы спроектирована, вставляют матовое стекло в прорезь осветителя.

2. Фокусируют микроскоп на исследуемый объект путем перемещения тубуса при открытых диафрагмах осветителя и конденсора.

3. Закрывают диафрагму осветителя и качанием зеркала добиваются ее изображения (светлый круг) в поле зрения микроскопа (см. рис. 12, 1). Затем изображение отверстия диафрагмы наводят на резкость перемещением конденсора (2) и устанавливают светлый круг в центр поля зрения при помощи зеркала (3).

4. Открывают диафрагму осветителя так, чтобы освещенный круг немного выходил за пределы поля зрения микроскопа (4).

5. Вынимают окуляр, закрывают диафрагму конденсора и смотрят в тубус. Необходимо увидеть закрытую диафрагму конденсора в выходном зрачке объектива. После этого диафрагму начинают открывать до тех пор, пока ее отверстие не совпадет с границами выходного зрачка объектива. Для повышения контрастности изображения диафрагму можно открыть до $\frac{2}{3}$ выходного зрачка объектива. Затем окуляр помещают в тубус. Светофильтр вставляют в прорезь осветителя. Силу

освещенности препарата регулируют реостатом осветителя или нейтральными светофильтрами.

6. Изучение препарата начинают с малого увеличения, затем переходят к более сильному сухому объективу и в последнюю очередь, если это необходимо, к иммерсионному. При замене объективов на более сильные заново устанавливают свет, поскольку последние имеют большую апертуру.

После знакомства с микроскопом, осветителем и установки света по Келеру в рабочую тетрадь записывают ответы на вопросы по следующей форме:

Марка микроскопа	Характеристика объективов						Увеличение окуляров	Увеличение бинокулярной насадки	Общее увеличение микроскопа	Полезное увеличение микроскопа	Апертура конденсора
	тип	увеличение	апертура	разрешающая способность, мкм	рабочее расстояние, мм	глубина резкости изображения					

Центрирование

В комплект многих микроскопов входит *центрировочная пластинка*. Она служит для совмещения оси вращения столика с центром поля зрения микроскопа. Эта пластинка имеет перекрестие и этикетку с указанием координат положения центра перекрестия по шкале столика и шкале препаратоводителя. Отсчеты устанавливают по нониусу.

Для центрировки используют слабые объектив 9X и окуляр 4X. Центрировочную пластинку помещают на столике микроскопа так, чтобы этикетка была около поворотной лапки препаратоводителя (рис. 13). После настройки освещения проверяют координаты по шкалам при помощи рукояток препаратоводителя. Сфокусировав тубус на перекрестие, совмещают центры перекрестия и поля зрения окуляра центрировочными винтами столика. Если окуляр имеет свое перекрестие, то совмещают центры перекрестий окуляра и пластинки. Таким образом находят исходное положение столика. После этого центрировочные винты трогать нельзя, а чтобы закрепить отцентрированное положение столика, поворачивают его стопорный винт до отказа.

В ряде случаев микроскоп или препаратоводитель снабжают центрировочной пластинкой без указания координат перекрестия. В таком случае необходимо самостоятельно определить их. Для этого при помощи шпильки у препаратоводителя отпускают винт, находящийся около начала горизонтальной

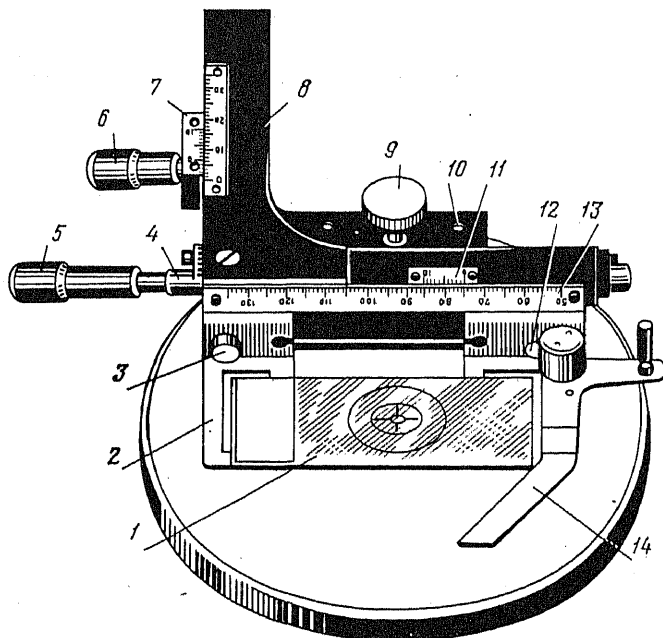


Рис. 13. Препаратоводитель СТ-12:

1 — центрировочная пластинка; 2, 14 — лапки; 3, 12 — винты, отпускаемые шпилькой; 4 — механизм перемещения; 5 — рукоятка перемещения препарата влево и вправо; 6 — рукоятка перемещения препарата вперед и назад; 7, 13 — шкалы; 8 — планка; 9 — зажимной винт; 10 — штифт, вставляемый в гнездо столика; 11 — нониус.

шкалы, и, перемещая прямоугольную лапку препаратововодителя, добиваются совмещения риски лапки с риской шкалы. Лапку закрепляют винтом, находящимся рядом с ней. Затем на столик помещают центрировочную пластинку. Добиваются совмещения перекрестия центрировочной пластинки и окуляра. Если при повороте столика на 360° изображение перекрестия пластинки не смещается относительно перекрестия окуляра, то можно считать, что ось вращения столика совпадает с визирной осью тубуса.

После этого на ярлыке центрировочной пластинки записывают номер микроскопа и координаты перекрестия по шкалам препаратововодителя.

Фокусирование

Когда наблюдатель убедится в том, что объективы и окуляры чистые (грязь удаляют сухой или смоченной в бензине батистовой тряпочкой), освещение настроено, столик отцентрирован,

можно начинать наблюдение препарата при малом увеличении, добиваясь фокусированием четкого изображения. Для этого нижняя линза объектива должна отстоять от объекта точно на фокусное расстояние, которое тем меньше, чем больше увеличение объектива.

Фокусировку микроскопа проводят при помощи тубуса, который опускают так, чтобы расстояние от объектива до препарата было меньше фокусного. Затем, глядя в окуляр, поднимают тубус макрометрическим винтом до тех пор, пока не будет видно изображение объекта. Для более точной установки служит микрометрический винт.

Особенно осторожно нужно фокусировать микроскоп во время работы с сильными объективами, чтобы не раздавить препарат и не повредить линзу объектива. В этом случае поступают следующим образом. Сначала находят изображение объекта при малом увеличении, затем меняют объектив и, глядя на него сбоку, опускают тубус так, чтобы расстояние между препаратом и объективом было минимальным. После этого подъемом тубуса проводят грубую установку фокуса, затем при помощи микрометрической подачи, наблюдая за объектом в окуляр, — его точную установку. Винт микрометрической подачи не следует вращать более чем на $\frac{1}{2}$ или $\frac{3}{4}$ полного оборота.

Найдя нужный участок препарата при помощи сильного сухого объектива, можно перейти к наблюдению с иммерсионным объективом. Для этого наносят по капле иммерсионной жидкости на фронтальную линзу объектива и препарат и опускают тубус до смыкания капель.

При работе с конденсорами, имеющими числовую апертуру 1,2 или 1,4, и объективами, имеющими апертуру более 1, необходимо создавать полную иммерсию, т. е. наносить иммерсионную жидкость не только на препарат, но и на конденсор. В этом случае полнее используется апертура.

Закончив работу с иммерсионным объективом, нужно протереть его и конденсор сначала сухой, а потом смоченной в бензине батистовой тряпочкой, тщательно удалив остатки иммерсионной жидкости.

Выбор светофильтров

Под светофильтром понимают среду, проходя через которую световой поток изменяется количественно или качественно. Нейтральные светофильтры изменяют световой поток количественно, так как пропускают в равной степени все монохроматические излучения. Селективные светофильтры изменяют световой поток качественно, они пропускают свет только определенной длины волны.

Светофильтры бывают разного назначения. Для повышения разрешающей способности применяют синие светофильтры дневного света СС1, СС2, СС4, которые необходимо использовать с апохроматами. Чтобы улучшить качество изображения, берут зеленые светофильтры, применяемые с объективами-ахроматами. Добиться контрастного изображения можно при помощи цветных светофильтров, используемых с соблюдением правила дополнительных цветов. Например, желтые светофильтры ЖС12, ЖС18 повышают контрастность изображения синих препаратов. Освещенность регулируют нейтральными светофильтрами и матовыми стеклами. При работе с люминесцентным осветителем для защиты от излучений на окуляр помещают светофильтр ЖС17. Матовые стекла и светофильтры обычно вставляют в держатель осветителя или помещают в откидное кольцо под конденсором.

Матовые стекла предназначены для рассеяния света, чтобы устранить неравномерность освещения поля, создаваемого электрическим источником света. Иногда электрический источник света помещают в баллон из матового стекла. Матовым стеклом можно пользоваться и при дневном освещении, помещая его под конденсор.

Нейтральные светофильтры поглощают часть световых лучей при освещении. Их применяют для снижения интенсивности света.

Из *цветных (селективных) светофильтров* часто пользуются светло-синими фильтрами дневного света. Они поглощают желтый и красный цвета и делают свет электрической лампочки похожим на дневной. Последний больше насыщен синим светом, тогда как электрический — красным. Поэтому одни и те же окрашенные препараты выглядят неодинаково при дневном и искусственном освещении. Кроме того, коротковолновый свет повышает разрешающую способность микроскопа, что особенно важно при работе с объективами, исправленными для синего света, например с апохроматами.

Работая с цветными светофильтрами, необходимо помнить, какие цвета являются дополнительными, т. е. при наложении друг на друга дают белый. Например:

чистый красный + сине-зеленый = белый;

чистый синий + желтый = белый;

чистый зеленый + пурпурный = белый.

При освещении монохроматическим светом окрашенного препарата детали, окрашенные в дополнительные к нему цвета, будут выглядеть темными, а совпадающие по цвету с излучением осветителя — светлыми. Поэтому, чтобы отчетливо видеть участки, окрашенные в желтый цвет, применяют синий светофильтр, в пурпурный цвет — зеленый. Последним часто поль-

зуются при изучении ацетокарминовых, ацетоорсеиновых препаратов, а также во время работы с фазово-контрастными устройствами и в микрофотографии для усиления контраста.

Работа с рисовальным аппаратом

Для подтверждения точности наблюдений в ходе исследования используют либо микрофотографию, либо зарисовку при помощи рисовального аппарата, позволяющего увидеть одновременно изображение объекта и лист бумаги с карандашом благодаря имеющейся в аппарате призме-кубик.

Рисовальный аппарат РА-4 (рис. 14, А) состоит из призмы-кубика Аббе, помещенной в откидной оправе, зеркала на штанге, двух наборов сменных дымчатых светофильтров (один из них находится в секторе, а другой — в барабане) и хомутика.

Аппарат РА-4 устанавливают на микроскоп в следующей последовательности.

1. Устанавливают свет и фокусируют препарат.
2. Вынимают из тубуса окуляр и закрепляют рисовальный аппарат хомутиком. Вставляют окуляр на место, при этом от-

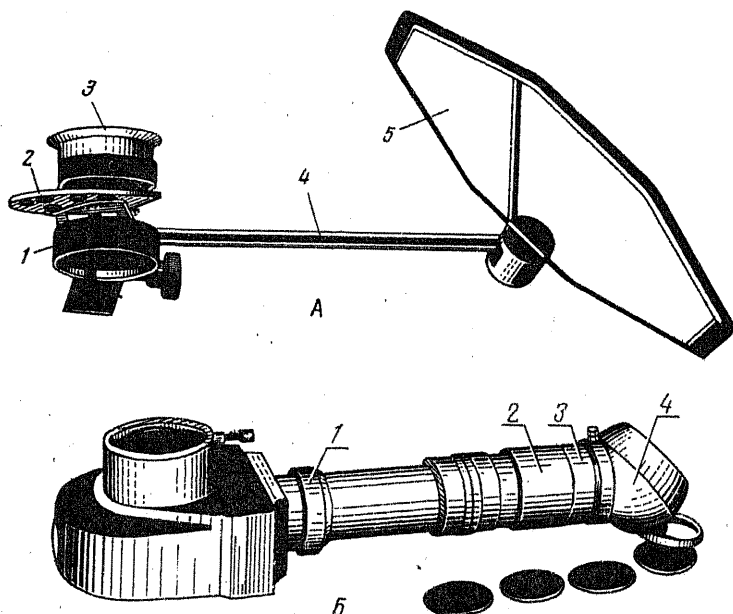


Рис. 14. Рисовальные аппараты:

РА-4 (А): 1 — хомутик; 2 — сектор со светофильтрами; 3 — откидная оправа с призмой-кубиком; 4 — штанга; 5 — зеркало; рисовально-проекционный аппарат РА-6 (Б): 1 — кольцо для изменения увеличения; 2 — кольцо для фокусировки карандаша; 3 — кольцо для перехода от изображения на экран к зарисовке и обратно; 4 — головка с зеркалом.

кидная оправа аппарата должна лечь на окуляр. Зеркало устанавливают под углом 45° к штанге.

3. Если микроскоп имеет наклонный тубус, для зарисовки используют наклонный столик, расположенный так, чтобы его поверхность была перпендикулярна оси тубуса. При прямом тубусе плоскость бумаги должна быть параллельна поверхности стола.

4. Чтобы увидеть одновременно изображение объекта, бумагу и конец карандаша, нужно уравнивать их освещенность. Яркость изображения объекта регулируют реостатом осветителя и набором сменных дымчатых светофильтров на секторе аппарата. Второй набор светофильтров, имеющийся на барабане аппарата, применяют для регулирования яркости изображения карандаша.

При помощи рисовального аппарата обводят карандашом на бумаге контуры изображения деталей препарата. Сначала лучше выполнить контурные рисунки простых объектов, например пылевых зерен, устьичных клеток, а затем более сложных, например хромосом.

При зарисовке сложных объектов можно воспользоваться сетчатым окуляром-микрометром. Сетку наносят на бумагу и в каждом ее квадрате обводят карандашом контуры определенных деталей микроскопического изображения.

Когда контурный рисунок готов, снимают препарат и на его место ставят объект-микрометр, чтобы сразу определить *увеличение рисунка*. Шкалу объекта-микрометра наносят на бумагу с рисунком. Например, 10 делений объекта-микрометра, по 0,01 мм каждое, занимают на бумаге отрезок длиной 90 мм. Отсюда нетрудно определить увеличение рисунка, оно равно $90 : (0,01 \cdot 10) = 900$.

К качеству рисунка необходимо относиться серьезно, так как рисунок не только фиксирует результаты наблюдения, — некоторые авторы справедливо рассматривают его как метод исследования. Поэтому контурный рисунок неоднократно сверяют с препаратом, дополнительно вносят все мелкие детали, а потом готовят полноценный рисунок, взяв за основу для передачи изображения черту и точку.

Модель рисовально-проекционного аппарата РА-6 показана на рисунке 14, Б. Этот аппарат применяют для зарисовки и проектирования изображения на экран. Так же, как в РА-4, здесь можно видеть одновременно препарат, лист бумаги и конец карандаша во время зарисовки. Включением другой призмы при помощи кольца 3 можно быстро спроецировать объект на экран. Устанавливают РА-6 между тубусодержателем и тубусом микроскопа.

Измерение объектов под микроскопом

В практике цитозембриологических исследований нередко измеряют пыльцевые зерна, замыкающие клетки устьиц, хромосомы, пыльцевые трубки, зародыши и т. д. Измерения под микроскопом проводят при помощи шкалы окуляра-микрометра (рис. 15, А). Чтобы перевести результаты полученных измерений в микрометры, т. е. установить истинные размеры объекта, необходим объект-микрометр. Окуляр-микрометр может входить в комплект микроскопа вместе с окуляром или приобретается отдельно. Он представляет собой круглую стеклянную пластинку, на которой нанесена линейка со 100 делениями.

Окуляр-микрометр вставляют в окуляр. На столик микроскопа кладут препарат и, глядя в окуляр, перемещают объект препаратопроводителем, а линейку микрометра — поворотом окуляра так, чтобы можно было измерить объект в делениях окуляра-микрометра. Одновременно записывают марку микроскопа и увеличения объектива и окуляра.

Измерив необходимое число объектов, препарат снимают и на столик микроскопа помещают объект-микрометр ОМП (для работы в проходящем свете), шкала которого имеет 100 делений (рис. 15, Б). Общая длина ее 1 мм, размер одного деления — 10 мкм. Шкалу объекта-микрометра совмещают со шкалой окуляра-микрометра, используя ту же самую комбинацию окуляра и объектива, которую применяли для измерения объектов. Удобнее всего совместить сначала нулевые точки шкалы. Например, при малом увеличении 100 делений объекта-микрометра, т. е. вся шкала, совпали с 80 делениями оку-

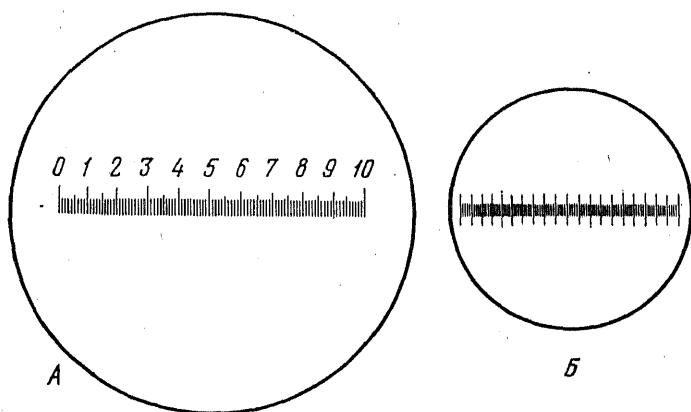


Рис. 15. Шкалы окуляра-микрометра (А) и объекта-микрометра (Б).

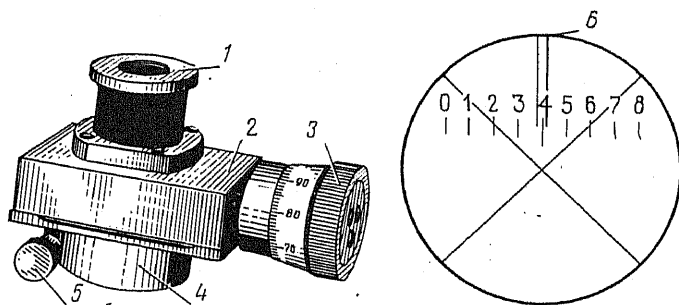


Рис. 16. Окулярный винтовой микрометр МОВ-1-15:

1 — окуляр; 2 — корпус; 3 — барабан; 4 — основание; 5 — винт хомутка; 6 — биштрих.

ляра-микрометра. Цену одного деления окуляра-микрометра вычисляют по формуле

$$\frac{A \times 10}{B}, \quad (8)$$

где A — число делений объекта-микрометра; B — число делений окуляра-микрометра; 10 — длина одного деления объекта-микрометра, мкм.

Подставив цифры в формулу, получим:

$$\frac{100 \times 100}{80} = 12,5 \text{ мкм.}$$

Это и есть цена деления окуляра-микрометра. Для получения истинного размера объекта необходимо умножить его длину или ширину, измеренную в делениях окуляра-микрометра на цену деления окуляра-микрометра в микрометрах. Например, диаметр пылевых зерен кукурузы составил 8 делений окуляра-микрометра. Следовательно, истинный диаметр пылевых зерен в микрометрах составит: $8 \cdot 12,5 = 100$.

Цена деления окуляра-микрометра, вычисленная для малого увеличения микроскопа, не годится для работы с большим увеличением. Поэтому перед началом измерений необходимо установить цену деления для всех комбинаций объективов и окуляров.

В тех случаях, когда требуется определить площадь или подсчитать число клеток в единице площади, в окуляр микроскопа помещают сетчатый окуляр-микрометр. Он представляет собой квадрат со стороной 10 мм, каждая из которых разделена линиями на 20 частей. Интервал между двумя линиями равен 0,5 мм.

Измерение сравнительно крупных объектов можно провести при помощи окулярного винтового микрометра МОВ-1-15 (рис. 16). Он состоит из окуляра с увеличением 15X, основа-

ния с хомутиком, надеваемого на тубус микроскопа, отсчетного приспособления с микрометрическим винтом и отсчетного барабана. В плоскости окуляра находятся неподвижная шкала с восемью делениями по 1 мм, подвижное перекрестие и индекс в виде биштриха. Отсчет проводят по шкале (в миллиметрах) и барабану (в сотых долях миллиметра).

До измерения объекта определяют увеличение объектива микроскопа. Для этого на столик микроскопа помещают объект-микрометр, на тубус надевают винтовой окулярный микрометр и фокусируют на резкость изображения перекрестия и шкалы объект-микрометра. Биштрих устанавливают в начале или в конце шкалы. Берут некоторое число делений объекта-микрометра, например 25. Подводят перекрестие к первому штриху шкалы и снимают отсчет, затем подводят перекрестие к двадцать пятому штриху и снова делают отсчет.

Линейное увеличение объектива определяют по формуле

$$V = \frac{M-N}{ab}, \quad (9)$$

где V — увеличение объектива; $M-N$ — разность двух отсчетов; a — число делений объекта-микрометра; b — цена деления объекта-микрометра.

Для измерения объекта на столик микроскопа помещают препарат, центр перекрестия совмещают с краем изображения объекта и делают отсчет. Затем перекрестие совмещают со вторым краем объекта и снова делают отсчет.

Размеры объекта определяют по формуле

$$C = \frac{M-N}{V}, \quad (10)$$

где C — длина или ширина объекта, мм; V — увеличение объектива; $M-N$ — разность отсчетов.

Во время выполнения работы необходимо, установив на столе микроскоп «Биолам Р» или МБР-3, добиться рационального освещения препарата по Келеру, подобрав необходимые светофильтры. Далее, воспользовавшись измерительным окуляром и объектом-микрометром, провести определение цены деления окуляра-микрометра и записать результаты в таблицу:

Марка и номер микроскопа	Номер измерения	Увеличение объектива, окуляра, насадки	Число делений		Цена деления, мкм
			объекта-микрометра (А)	окуляра-микрометра (Б)	

Затем провести определение диаметра пылевых зерен у разных сельскохозяйственных культур и записать результаты в следующую таблицу:

Номер измерения	Название рода и вида растения	Увеличение микроскопа	Диаметр пылевых зерен в делениях окуляра-микрометра	Цена деления окуляра-микрометра, мкм	Диаметр пылевого зерна, мкм

Подсчет клеток в счетных камерах

Счетная камера Горяева представляет собой толстое предметное стекло с углублением в центре в виде прямоугольника. На дне углубления нанесена сетка из 400 квадратов общей площадью 1 мм², а площадь одного малого квадрата $\frac{1}{400}$ мм², большого — $\frac{1}{35}$ мм². Глубина камеры 0,1 мм, один малый квадрат с учетом этой глубины ограничивают объем $\frac{1}{4000}$ мм³, или $\frac{1}{4\,000\,000}$ мл, поскольку 1 мл = 1000 мм³.

Каплю суспензии с клетками помещают в центр камеры, накрывают покровным стеклом, тщательно притирая его по краям камеры до появления ньютоновых колец. Подсчет начинают через 3—5 мин, после того как клетки осели. Клетки считают в 10 больших или в 20 малых квадратах, перемещая их по диагонали. Число клеток в 1 мл суспензии (M) определяют по формуле

$$M = \frac{a \cdot 1000n}{hs},$$

где a — среднее число клеток в квадрате сетки; h — глубина камеры, мм; s — площадь квадрата сетки, мм²; 1000 — коэффициент перевода см³ в мм³; n — разведение.

Если в одном квадрате пять клеток и не было разведения, то в 1 мл суспензии находится

$$M = \frac{5 \times 1000}{0,1 \times 1/400} = 20\,000\,000 \text{ клеток.}$$

Для проверки подсчеты повторяют 3—4 раза на новых пробах. Если суспензию нужно развести, то 1 мл ее сначала помещают в пробирку, в которой налито 9 мл дистиллированной воды. Это будет разведение 1:10. После перемешивания этой смеси из нее берут 1 мл и вносят в другую пробирку с 9 мл воды. Это будет разведение 1:100, из этой смеси аналогичным образом можно приготовить разведение 1:1000 и т. д.

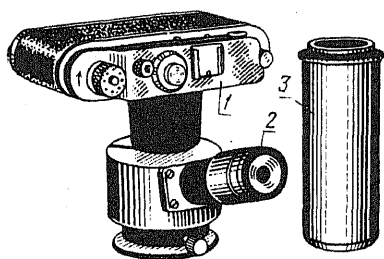


Рис. 17. Микрофотонасадка МФН-12:

1 — фотокамера; 2 — визирная трубка;
3 — вертикальный тубус.

Микрофотография

Регистрация изображения препарата с использованием микрофотографии получает все большее распространение, хотя она не всегда может заменить собой рисунок.

Для микрофотографии необходимо следующее оборудование: *микрофотонасадочная камера, микрофотонасадка, или микрофотоустановка, биологический микроскоп, осветитель со светофильтрами.*

На рисунке 17 показана микрофотонасадка МФН-12 с плечной фотокамерой, используемая с «Биолам Р» и МБР-3. Она снабжена окулярами 7Х и 10Х, вертикальным тубусом и светофильтрами. В корпусе МФН-12 размещена светоделительная призма, которая делит световой поток, выходящий из окуляра, на два пучка. Один из них она направляет на фотопленку (60% света), а другой — в глаз наблюдателя. Для контроля резкости изображения на фотоэмульсионном слое пользуются визирной трубкой. В ней имеются окуляр, объектив и сетка (или матовое стекло), которая представляет собой стеклянную пластинку с прямоугольной рамкой. В центре рамки помещено перекрестие (или биштрихи).

Перед тем как делать снимок с препарата, необходимо добиться, чтобы сетка и изображение объекта были видны одновременно резко. На окуляр можно поместить дымчатый светофильтр, чтобы сильный свет не попадал в глаза.

К микроскопам МБС-1, МБС-2 выпускается микрофотонасадка МФН-5. Универсальная пластинчатая микрофотонасадка МФН-7 (размер пластинок 6,5×9 см) приспособлена к различным моделям микроскопов, имеющих стандартное гнездо для окулярного тубуса. Достоинство микрофотонасадки МФНЭ-1 — автоматический экспонометр. Микроскоп МБИ-15 снабжен фотокамерой с автоматическим экспонометром. При работе с микроскопом МББ-1 предпочтительнее пользоваться микрофотонасадкой МФН-11, но можно и МФН-7, МФН-8, МФН-9, МФН-12, а с микроскопами «Биолам Р», кроме МФН-12, еще и МФН-7 и МФН-8.

Во время микрофотосъемки можно использовать обычные осветители (ОИ-19, ОИ-9м) или специально предназначенный для фотосъемки (ОИ-24, лампа 12 В, 100 Вт).

Существуют специальные приборы для микрофотосъемки — микрофотоустановки ФМН-3 и ФМН-2. Прибор ФМН-3

(рис. 18) имеет пластинчатую фотокамеру (размер пластинок 9×12 см) с раздвижным мехом, фотозатвор, осветитель с лампой накаливания мощностью 170 ватт и светофильтрами, зеркальную насадку для фокусирования изображения и визуальную насадку, которую устанавливают вместо тубуса на микроскопе и в нее вместо окуляра помещают гомаль. Прибор ФМН-2—универсальный, он предназначен для фотографирования как микро-, так и макрообъектов. Этими приборами удобнее всего делать снимки с микроскопом МБИ-3, но можно применять и рабочие биологические микроскопы.

Кроме микрофотонасадок и микрофотоустановок, с микроскопом можно использовать малоформатные зеркальные фотоаппараты типа «Зенит» («Зенит-С» и «Зенит-3М») со специальными приспособлениями в виде колец (не путать с удлинительными кольцами, выпускаемыми для фотоаппаратов; они непригодны для микрофотосъемки!) или переходными муфтами, которые насаживают на тубус микроскопа. Для фотосъемки фотоаппарат с удаленным объективом соединяют с тубусом микроскопа при помощи этих колец или муфт.

Иногда для микрофотосъемки приспособляют вертикаль-

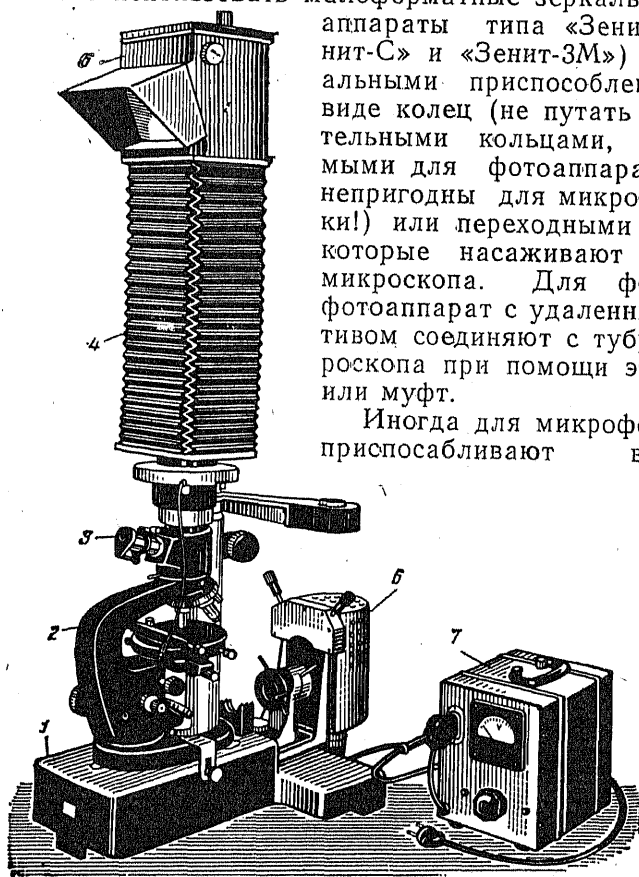


Рис. 18. Прибор для микрофотосъемки ФМН-3:

1 — основание; 2 — микроскоп; 3—4 визуальная насадка с раздвижным мехом; 5 — зеркальная насадка; 6 — осветитель; 7 — трансформатор к осветителю.

ную пластинчатую фотокамеру с раздвижным мехом, удалив из нее объектив. Микроскоп ставят под фотокамерой так, чтобы окуляр был против центра отверстия объектива и центра матового стекла. Используют осветитель ОИ-24.

Перед любой микрофотосъемкой тщательно удаляют пыль с микроскопа. Освещение препаратов устанавливают по Келеру. В момент фотосъемки лампе осветителя дается максимальный накал. Микрофотографирование препаратов с небольшим увеличением ведут с низкоапертурным конденсором.

При подборе светофильтров учитывают их назначение. Черно-белые объекты можно фотографировать без них или с зелеными и синими светофильтрами, усиливающими контраст. Препараты, на которых преобладают светло-синие и голубые тона, фотографируют с оранжевым светофильтром, а красные — с зеленым. Для окрашенных препаратов необходимы объективы-апохроматы. Если во время микрофотографирования применяют иммерсионный объектив, диафрагму конденсора оставляют открытой. Иммерсионное масло не должно иметь пузырьков.

Большое значение придается центрированию системы (источник света — оптическая ось микроскопа — центр матового стекла) и установке на резкость по матовому стеклу. Эти операции тщательно выполняют до съемки.

Выбор экспозиции в микрофотографии зависит от многих причин: источника света и светофильтров, комбинации объектива и окуляра (экспозиция обратно пропорциональна квадрату апертуры), среды между препаратом и объективом, объекта, фотоматериала и др. Удобно устанавливать выдержку автоматическим экспонометром. Если его нет, то выдержку подбирают.

При использовании пластинчатых микрофотонасадок после установки освещения и проверки на резкость по матовому стеклу выключают свет, вставляют кассету с фотопластинкой и выдвигают ее шторку на $\frac{1}{4}$. Экспонируют, например, 5 с (по секундомеру) с включенным светом. Гасят свет, выдвигают шторку еще на $\frac{1}{4}$ и вновь дают ту же экспозицию, повторяют эту операцию еще два раза. В результате на одной фотопластинке будет четыре экспозиции: 20, 15, 10 и 5 с. После ее проявления выбирают необходимое время экспозиции. Пленочными микрофотонасадками делают несколько пробных снимков с разной экспозицией, проявляют их и выбирают лучший.

Правильная передача тонов фотографируемого препарата зависит, кроме экспозиции, от фотоматериалов и их обработки после фотосъемки. Лучше всего иметь набор низкочувствительных мелкозернистых фотопластинок, отличающихся по спектральной светочувствительности, назначению, контрастности (нормальные и контрастные). Ортохроматические диапозитив-

ные или орторепродукционные фотопластинки желательно иметь двух сортов: полутоновые и штриховые (более жесткие). Орторепродукционные пластинки используют для съемки мало-контрастных препаратов. Ортохроматические и панхроматические пластинки применяют для правильной цветопередачи окрашенных препаратов.

При экспонировании на фотоэмульсии образуется скрытое изображение объекта. Затем в процессе проявления засвеченное галоидное серебро фотоэмульсии восстанавливается в металлическое; частицы металлического серебра увеличиваются во много раз, и скрытое изображение становится видимым. Остатки галоидного серебра, чувствительные к свету, необходимо удалить при обработке фиксажем.

Обрабатывают фотоматериалы после определенной экспозиции в метолгидрохиноновом проявителе Чибисова и кислом фиксаже.

Состав метолгидрохинонового контрастного проявителя Чибисова

Вода	До 1000 мл
Метол	1 г
Сульфит натрия безводный	26 г
Гидрохинон	5 г
Сода безводная	20 г
Бромат калия	1 г

Состав кислого фиксажа

Вода	До 1000 мл
Гипосульфит (тиосульфат) натрия	250 г
Метабисульфит калия	25 г

Время проявления при 20°C для негативных пленок — 6—8 мин, репродукционных и диапозитивных пластинок — 4, фотобумаги — 2 мин. Время закрепления в фиксаже — 5—10 мин.

Если контраст негатива невысокий, для получения наибольшего количества деталей для фотопластинок, кинофотопленок и фотопленок применяют метолгидрохиноновый мелкозернистый проявитель с бурой (Д-76). Состав его следующий:

Вода (30—45°C)	750 мл
Метол	2 г
Сульфит натрия безводный	100 г
Гидрохинон	5 г
Бура кристаллическая	2 г
Вода холодная	До 1 л

Время проявления в бачке — 18 мин, в кювете — 14.

При съемке препаратов во время наблюдений методом темного поля или фазового контраста используют средне- и высокочувствительную пленку «Изопанхром 18». Для окрашенных препаратов обычно применяют изоортохроматические фотоматериалы, но, если на препарате имеются участки красного цвета, лучшие результаты дают панхроматические и изопанхроматические фотоматериалы. Снимки на последних получаются более

выразительными. В последнее время в микрофотографии используют негативные пленки, предназначенные для микрофильмирования (Микрат-300), мелкозернистые, с высокой разрешающей способностью.

Состав проявителя для пленки Микрат-300

Метол	5 г
Сульфит натрия безводный	40 г
Гидрохинон	6 г
Поташ (карбонат калия)	40 г
Бромат калия	6 г
Вода	До 1000 мл

Температура проявления 20°C. Время проявления 6 мин. Можно использовать проявитель Д-76, но при этом время проявления увеличивается в 2,5—3 раза.

Состав фиксажа для пленки Микрат-300

Гипосульфит натрия	250 г
Сульфат натрия безводный	25 г
Серная кислота (плотность 1,84)	5 мл
Вода	До 1000 мл

Очень важно в микрофотографии определить *увеличение изображения*. Для этого на столик микроскопа после фотосъемки препарата помещают объект-микрометр, который проектируется на матовое стекло фотокамеры. Объект-микрометр фотографируют при той же комбинации окуляра и объектива, что и снимок, а затем точно измеряют одно деление и переносят на снимок. Можно объект-микрометр не фотографировать, но точно измерить одно его деление на матовом стекле. В обоих случаях после этого необходимо вычислить отношение размера деления объекта-микрометра на стекле фотокамеры к действительной его величине. Например, на матовом стекле размер одного деления объекта-микрометра равен 5 мм, а в действительности — 0,01 мм. Разделив первое число на второе (5:0,01), получим увеличение изображения. Оно равно 500.

Если фотосъемку ведут камерой с раздвижным мехом и во время съемки используют окуляр и объектив микроскопа, то определить масштаб изображения можно по формуле

$$B = V_{об} V_{ок} \frac{K}{P}, \quad (11)$$

где B — масштаб изображения; $V_{об}$ и $V_{ок}$ — увеличение объектива и окуляра; K — длина камеры; P — расстояние наилучшего видения (250 мм).

МЕТОДЫ НАБЛЮДЕНИЯ ПРИ ПОМОЩИ МИКРОСКОПА

Обычно световой поток от источника света при отсутствии препарата образует в поле зрения микроскопа равномерный фон — «невозмущенный свет». Если положить на предметный столик

препарат, то неоднородные частицы объекта, отличающиеся друг от друга и от окружающей среды по поглощению света и показателю преломления, образуют рассеянный свет, который и создает изображение. В результате наложения рассеянного и невозмущенного света возникает интерференция, определяющая в зависимости от соотношения фаз и амплитуд световых колебаний контраст освещенности изображения.

При микроскопировании объекты исследования подразделяют на: *прозрачные и непрозрачные, амплитудные и фазовые, изотропные и анизотропные* (см. ниже). Для разных объектов, обладающих неодинаковой способностью рассеивать свет, применяют свои характерные методы наблюдения. При оценке любого метода обычно учитывают два критерия: во-первых, какие вопросы можно решить при помощи данного метода, во-вторых, его доступность.

Метод светлого поля

Метод светлого поля в проходящем свете — один из наиболее распространенных и доступных для наблюдения. При прямом освещении им пользуются для изучения *прозрачных* объектов, у которых различные участки неодинаково поглощают свет, что и служит основой для создания изображения. К прозрачным объектам относятся срезы и отдельные клетки растений, которые монтируют на предметных стеклах и накрывают покровными.

В цитологии, эмбриологии, анатомии и цитохимии методом светлого поля в проходящем свете широко пользуются для изучения окрашенных препаратов.

Для изучения *непрозрачных* биологических объектов (например, мелких плодов) можно применить метод светлого поля в отраженном свете, при котором освещение идет сверху через объектив, служащий одновременно и конденсором.

Метод косого освещения относят к методу светлого поля. Косое освещение достигается путем смещения апертурной диафрагмы в направлении, перпендикулярном к оптической оси. Эффект косого освещения можно наблюдать в микроскопах с использованием конденсора ОИ-14.

Метод темного поля

При наблюдении объектов методом темного поля невозмущенные лучи осветителя не попадают в объектив и изображение создается только рассеянными лучами, идущими от объекта. В этом случае в объектив попадает свет, отраженный от объекта, и тогда можно увидеть на темном поле светящиеся ультрамикроскопические частицы, размер которых меньше предельной

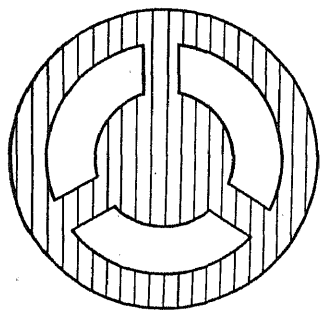


Рис. 19. Центральная диафрагма для темного поля. По Г. Аппельту.

разрешающей способности объектива. Однако точно измерить и определить форму частиц трудно. Этот метод был разработан австрийским ученым Р. Зигмонди.

Темнопольную микроскопию в проходящем свете используют для получения изображения *прозрачных* объектов, плохо видимых при наблюдении в светлом поле, например живых клеток. Вместо обычного здесь применяют темнопольный конденсор ОИ-13, освещающий объект сбоку. Прямые лучи в объектив не попадают, фон получается темным, а яркость объекта достигается за счет рассеяния света от отдельных его частиц.

Темное поле позволяет вести наблюдения за изменением степени дисперсности коллоидов протопласта. Здесь легко установить явление коагуляции. Совершенно по-разному выглядят на темном поле погибающие и нормальные клетки. Протопласт погибающих клеток ярко светится, тогда как у нормальных он светится слабо, за исключением оболочки.

В темном поле можно увидеть мелкие органеллы, например митохондрии. В качестве объектов для наблюдения в темном поле можно использовать эпидермис луковиц лука, корневые волоски пшеницы, водоросль спирогиры и др. Метод позволяет увидеть бактерии, поэтому его применяют в микробиологии. При темнопольной микроскопии необходимо соблюдать ряд правил:

иммерсионная жидкость и препарат не должны содержать пузырьков воздуха. Во время работы препарат касается иммерсионной жидкости, которую наносят на верхнюю линзу конденсора;

берут предметные стекла толщиной 0,8—1,2 мм, покровные — 0,17 мм. Стекла должны быть абсолютно чистыми, так как каждая пылинка рассеивает свет и создает нежелательное освещение темного поля;

объекты должны быть малой толщины (лучше, если клетки расположены в один слой). Толстые объекты непригодны. Средой для заключения объектов обычно служит вода;

необходимы темнопольный конденсор ОИ-13 (см. рис. 2, Б) или центральная диафрагма (рис. 19), которую можно изготовить из черной плотной бумаги. Внутренний диаметр такой диафрагмы (в мм) зависит от апертуры объектива ($D=20A$), а наружный равен диаметру откидного кольца конденсора. Центральную диафрагму удобно приклеить на матовое стекло;

необходима тщательная центровка света с соблюдением принципа Келера;

наиболее контрастные изображения получают при малых увеличениях объектива с открытой диафрагмой конденсора.

Проводить наблюдения методом темного поля можно при помощи микроскопов «Биолам Р», МБР-3, МБИ-3, а также микроскопов МББ-1, МБИ-11 и МБИ-15, в комплекты к которым входят темнопольные конденсоры.

Порядок работы с использованием конденсора ОИ-13 следующий.

1. Устанавливают осветитель перед микроскопом, включают его и направляют пучок света на зеркало.

2. Удаляют конденсор ОИ-14, объектив и окуляр, а затем прикрывают диафрагму осветителя.

3. На тубус помещают матовое стекло и зеркалом центрируют пучок света.

4. Ставят конденсор ОИ-13 и на его верхнюю линзу наносят каплю иммерсионной жидкости. Помещают препарат на столик и подъемом конденсора добиваются соприкосновения жидкости с предметным стеклом. Затем ввинчивают слабый объектив.

5. После фокусировки микроскопа в поле зрения должно появиться кольцо с темным пятном в центре. Темное пятно исчезает при подъеме конденсора. Неправильная форма светлого пятна указывает на то, что капля иммерсионной жидкости мала. Центрировочными винтами конденсора смещают светлое пятно в центр и приступают к наблюдению.

6. При работе с иммерсионными объективами внутрь их вкладывают специальную диафрагму для понижения апертуры до 0,85.

При использовании центральной диафрагмы ее помещают под столик микроскопа на откидное кольцо конденсора, диафрагму которого оставляют открытой. На верхнюю линзу конденсора наносят каплю дистиллированной воды.

Метод фазового контраста и интерференционная микроскопия

Почти все живые клетки прозрачны для видимого света, т. е. световые волны, проходя через клетку, почти не теряют своей интенсивности, хотя фаза их изменяется. Человеческий глаз, фотопластинка и фотоэлемент не способны улавливать фазовые изменения, но зато реагируют на изменение интенсивности света, т. е. его амплитуды. Этого можно добиться окрашиванием объекта, но для живых клеток такой прием нежелателен.

В ранних исследованиях прозрачные объекты изучали или путем частичного закрытия ирисовой диафрагмы конденсора, что сопровождается потерей разрешающей силы, или путем

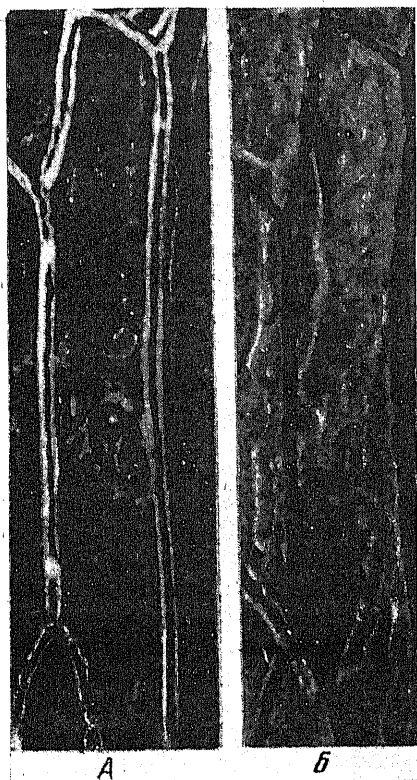


Рис. 20. Клетки верхнего эпидермиса лука:

А — фазово-контрастное изображение живых клеток, Б — те же клетки в светлом поле микроскопа. По В. Г. Конареву.

косого освещения. Голландский физик Цернике указал на возможность использования метода фазового контраста для наблюдения *прозрачных объектов*. Применяя этот метод, можно увидеть в живых клетках процесс митоза, хромосомы, митохондрии, мелкие включения, изучать действие на них физических и химических агентов и фиксаторов.

Метод основан на выявлении сдвигов фазы световых колебаний. Сдвиг фазы происходит вследствие неодинаковой скорости распространения света в средах различной плотности. Так как фазовые изменения не улавливаются глазом, то их преобразуют в амплитудные.

Объективы для фазового контраста имеют фазовую пластинку в виде кольца, которая получается в результате распыления специального вещества, образующего слой толщиной в несколько десятых долей микрометра. Апертурная диафрагма на конденсоре также кольцевая и имеет такие размеры, что ее изображение, передаваемое через конденсор и объектив, полностью укладывается на фазовое кольцо объектива.

Фазовое кольцо выполняет две функции: поглощает часть прошедшего света и сдвигает фазу невозмущенных лучей на $\pi/2$. Если свет задерживается по фазе, то объект выглядит светлее фона. Это так называемый *негативный фазовый контраст*. При позитивном фазовом контрасте происходит опережение по фазе.

Указанный метод не изменяет разрешающей способности микроскопа, но чувствительность его возрастает, а слабые включения прозрачных объектов, невидимые в светлом поле, дают контрастную интерференцию с фоном и становятся видимыми.

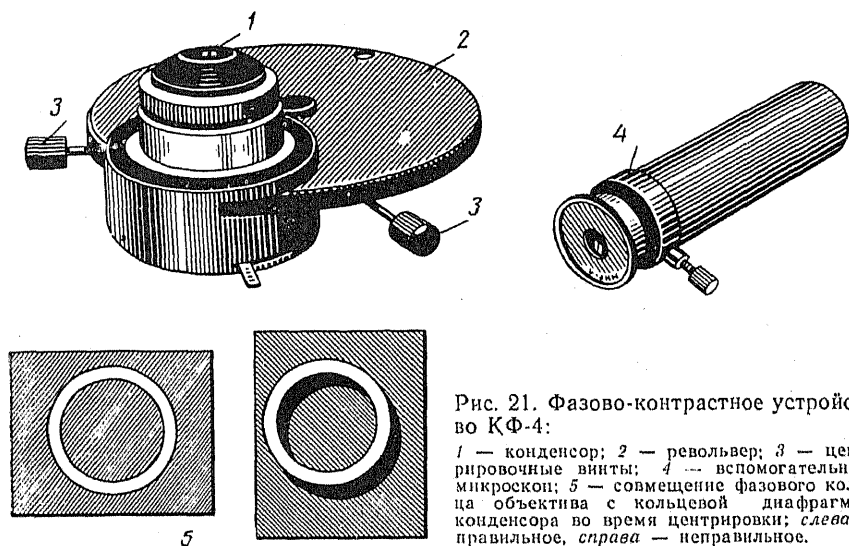


Рис. 21. Фазово-контрастное устройство КФ-4:

1 — конденсор; 2 — револьвер; 3 — центрировочные винты; 4 — вспомогательный микроскоп; 5 — совмещение фазового кольца объектива с кольцевой диафрагмой конденсора во время центровки; *слева* — правильное, *справа* — неправильное.

Хороший объект для наблюдения митоза в прижизненном состоянии методом фазового контраста — волоски тычиночных нитей из молодых бутонов традесканции. Эпидермис лукович репчатого лука можно использовать для наблюдения митохондрий (рис. 20). Растительные клетки, содержащие много зерен хлорофилла и других пигментов, дают неудовлетворительные изображения в фазовом контрасте.

Для проведения исследований необходимо к биологическому микроскопу иметь фазово-контрастное устройство КФ-4, состоящее из фазового конденсора с револьвером, вспомогательного микроскопа (рис. 21), специальных объективов, на оправе которых имеется буква Ф. Выпускается также модель КФ-5.

Эффект фазового контраста наблюдается в том случае, если удается совместить фазовое кольцо объектива с кольцевой диафрагмой конденсора. Порядок работы при установке фазово-контрастного устройства следующий.

1. Заменяют в микроскопе обычный конденсор и объектив на фазовые. При этом фазовый конденсор устанавливают для нормального освещения по методу светлого поля (на 0).

2. Устанавливают свет по Келеру и фокусируют тубус на препарат. Диафрагму конденсора оставляют полностью открытой.

3. Вынимают окуляр, вставляют в тубус вспомогательный микроскоп и фокусируют его резко на изображение темного кольца в выходном зрачке объектива, не трогая рукояток грубой и тонкой подачи микроскопа.

4. Устанавливают диск револьвера на цифру, соответствующую увеличению объектива, например на 10 или 40.

5. Центрируют кольцевую диафрагму конденсора (светлое кольцо) с фазовым кольцом объектива (темное кольцо) центрировочными винтами револьвера (см. рис. 21,5). Оба кольца должны совместиться.

6. Вынимают вспомогательный микроскоп и на его место в тубус вставляют окуляр.

Для работы методом фазового контраста при изучении неокрашенных препаратов используют зеленые светофильтры, окрашенных объектов — светофильтр того же цвета, что и объект.

Для исследования тонких неконтрастных препаратов, кроме метода фазового контраста, применяют *фазово-темнопольный метод*, позволяющий различить меньшие разности оптических плотностей. Фазово-темнопольные объективы имеют более высокую разрешающую способность, чем фазовые. Для работы необходимо специальное устройство МФА-2, которое используется с биологическими микроскопами.

Почти не отличается от фазово-контрастного устройства *аноцентриальный микроскоп*, в котором нет фазовой пластинки, но вблизи выходного зрачка объектива наносится поглощающая кольцевая пленка из копоти.

К методу фазового контраста близок принцип действия *интерференционного микроскопа*, схему которого для прозрачных объектов составил в 1932 г. А. А. Лебедев. В этом микроскопе свет сначала делится на два пучка, а затем они воссоединяются. Каждый пучок света после разделения имеет свой путь. Один из них проходит через объект, а другой — мимо него. Луч, проходя через объект, испытывает фазовый сдвиг, который можно измерить. Так как величина фазового сдвига связана с плотностью структуры, то таким образом можно определить содержание сухого вещества в клеточных структурах.

Для определения используют формулу

$$P = \frac{rs}{100\alpha},$$

где P — масса, г; r — величина фазового сдвига, см; s — площадь объекта, см²; α — константа (для белков $\alpha=0,0018$).

В отличие от фазового контраста в интерференционном микроскопе живая клетка может иметь вид окрашенного препарата вследствие того, что на вторичное изображение объекта накладывается дополнительная световая волна, от взаимодействия с которой получается контрастное или цветное изображение.

Метод наблюдения в поляризованном свете

Для изучения объектов, обладающих *двойным лучепреломлением* (крахмальные зерна, растительные волокна, кристаллы и др.), используют метод наблюдения в поляризованном свете. В цитологии этот метод применяют для изучения структуры митотического веретена, фибриллярных белков, крахмала и т. д.

Поляризованный свет отличается от обычного следующим свойством. Обычный свет распространяется в виде поперечных волн в различных направлениях. Если добиться колебания волн в одном направлении, то свет будет поляризованным.

Для наблюдений в поляризованном свете при помощи обычного микроскопа необходим *поляризатор*, помещаемый под конденсор микроскопа, и *анализатор*, который должен находиться над объективом. Для установки анализатора тубус снимают, кладут на объектив анализатор и устанавливают тубус. Менять объективы при наблюдении нельзя, чтобы не повредить анализатор.

При поляризации интенсивность света значительно уменьшается. От поляризатора свет идет к анизотропному объекту, оптические свойства которого неодинаковы в различных направлениях. Такой объект в отличие от аморфных и изотропных объектов способен влиять на поляризованный свет.

Падая на объект, пучок света разделяется на два луча, поляризованных во взаимно перпендикулярных плоскостях. Один из них подчиняется обычному закону преломления (обычный луч), другой проходит через объект с иной скоростью (необычный луч). Поэтому выходить из объекта они будут неодновременно. Разность хода лучей можно измерить.

Для исследования изменения поляризованного света, прошедшего через объект, применяют анализатор, который помещают над объективом. Можно использовать красители: метиленовый синий, акридиновый оранжевый, риванол и др.

Во время наблюдений поляризатор и анализатор устанавливают строго параллельно. Плоскость поляризации вращается так, чтобы на темном поле анизотропные объекты ярко светились. Предметные столики специальных поляризационных микроскопов круглые, вращаемые, с лимбом для измерения углов поворота. Объективы — ахроматы. Поляризационная оптика входит в комплект микроскопов МБР-3, МББ-1, МБИ-15, кроме того, существует несколько моделей «Полам».

Метод флуоресцентной и ультрафиолетовой микроскопии

В последние годы при изучении биологических препаратов все чаще стали использовать метод флуоресцентной мик-

роскопии, при котором препарат рассматривают в свете, излучаемом самим препаратом.

Метод основан на том, что ряд соединений в клетке (хлорофилл, хинин, берберин) при освещении коротковолновыми лучами (фиолетовыми, ультрафиолетовыми и др.) способен светиться под микроскопом желто-зеленым или оранжевым светом на темном фоне. Это так называемая *собственная флуоресценция*. Происходит она потому, что молекулы объекта после поглощения света сначала переходят в возбужденное состояние, а затем возвращаются в нормальное. Последний процесс сопровождается испусканием света, который теперь имеет не короткую, а гораздо большую длину волны, характерную для желто-зеленого или оранжевого света. Процесс испускания света называют *люминесценцией*. Если свечение прекращается сразу с прекращением возбуждения, то это явление называют *флуоресценцией* в отличие от *фосфоресценции*, т. е. длительного свечения после прекращения возбуждения.

Нефлуоресцирующие вещества можно обработать специальными *флуорохромами* и также наблюдать флуоресценцию, которая чаще используется в микроскопии, особенно в работе с живыми объектами для выявления локализации различных веществ.

К флуорохромам относятся: акридин желтый, акридин оранжевый, аурамин 00, конго красный, корифосфин, нейтральный красный, пиронин «Ж», примулин, родамин «С», родамин «6Ж», тиазиновый красный, титановый желтый, трипафлавин, флуоресцеин, флуоресцеин-натрий (уранин), фуксин кислый (рубин «С»), хризоидин, эозин-натрий, пирозолоновый желтый (тартразин), эритрозин. Эти вещества применяют в очень сильных разведениях (до 10^{-4}) и хранят в посуде из темного стекла. Чаще всего используют акридиновые красители и анилиновый синий. Первые для выявления нуклеиновых кислот, второй — пылевых трубок.

Препараты, окрашенные флуорохромами, изучают в среде, которая не флуоресцирует под давлением коротковолновых лучей, — в воде, глицерине, вазелиновом масле или физиологическом растворе.

Для наблюдения объектов этим методом необходимо иметь: биологический микроскоп; источник возбуждения флуоресцентного света; светополитры двух типов:

выделяющие из источника света коротковолновые лучи (устанавливают после источника света, т. е. до объекта);

задерживающие возбуждающее излучение и обеспечивающие видимость объекта (ставят после объекта);

флуорохромы.

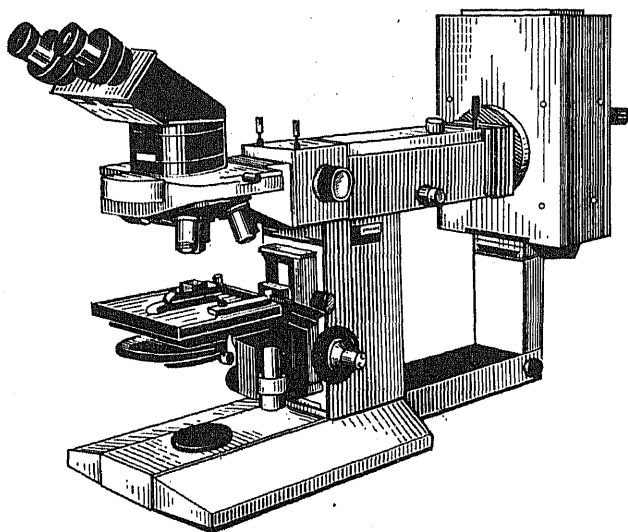


Рис. 22. Люминесцентный микроскоп «Люам Р».

Наблюдать флуоресценцию можно при помощи устройства ОИ-17, которое используют с биологическими микроскопами, источником света служит ртутная лампа. Кроме этого, ранее выпускались микроскопы: МЛ-2 — для отраженного и проходящего света, МЛ-3 — для отраженного света. Современная промышленность изготавливает для работы флуоресцентным методом микроскопы «Люам Р» (рис. 22) и «Люам И». Принцип действия флуоресцентного микроскопа не отличается от обычного, но осветительная и наблюдательная системы снабжены специальными светофильтрами. Объективы имеют на корпусе букву «Л».

Источником света служат лампы ртутно-кварцевые СВД-120А (сверхвысокого давления) и ДРШ-250 (дуговая, ртутная, шаровая). Более яркой является лампа ДРШ-250, которая включается через пульт. Есть лампы типа КИМ. В качестве осветителей используют ОИ-17, ОИ-18, ОСЛ-1 в виде приставок к микроскопу.

Для выделения коротких лучей служат светофильтры ФСЗ (фиолетовое стекло), СС14 (синее стекло), СС15, «запирающие» светофильтры ЖСЗ, ЖС18, Т1Н, Т2Н. Те и другие используют в определенных сочетаниях.

Флуоресцентный метод широко применяют в цитофизиологии. Он позволяет изучать живые объекты, устанавливать локализацию различных веществ и патологические изменения в тка-

нях, диагностировать заболевания в фитопатологии, выявлять пыльцевые трубки в эмбриологии и т. д.

Повышенный интерес исследователей к изучению строения и химическому составу различных структур клетки на неокрашенных препаратах, потребность количественного изучения нуклеиновых кислот и других соединений привели к использованию в микроскопии метода наблюдения в ультрафиолетовых лучах. В ультрафиолетовой части спектра находятся спектры поглощения многих веществ. Метод позволяет значительно увеличить разрешающую способность микроскопа, поскольку здесь работают лучи с короткой длиной волны. Кроме того, он дает возможность повысить контрастность неокрашенных препаратов, так как отдельные вещества препарата по-разному поглощают коротковолновые лучи, т. е. имеют свой спектр поглощения. Это позволяет судить о его химическом составе. Так, нуклеиновые кислоты не поглощают видимый свет, но способны поглощать ультрафиолетовые лучи определенной длины волны. Шведский ученый Касперсон разработал методику анализа клеточных структур с учетом этого явления.

Для наблюдения объектов в лучах с короткой длиной волны шведский ученый Е. М. Брумберг сконструировал ультрафиолетовый микроскоп МУФ-1 и предложил метод цветовой трансформации. Один из вариантов этого метода — фотографический — заключается в получении с бесцветных препаратов цветных микрофотографий, окраска которых определяется спектрами поглощения определенных веществ препарата в ультрафиолетовых лучах. Для этого можно воспользоваться биологическим микроскопом, имеющим оптику, прозрачную для ультрафиолетовых лучей (зеркально-линзовые объективы, кварцевый коллектор, кварцевые предметные и покровные стекла). Осветителем служит кварцевая ртутная лампа.

При помощи светофильтров выделяются лучи различной длины волны в невидимой ультрафиолетовой области спектра. Фотоснимки препаратов делают в лучах трех различных длин волн.

Цветные изображения получают при помощи специального прибора — *хромоскопа*, проектирующего одновременно три микрофотографии на один экран. При этом каждый снимок освещается определенными видимыми лучами (синими, зелеными или красными). Путем цветовой трансформации удастся выделить различные вещества клетки.

Прямые визуальные наблюдения в ультрафиолетовых лучах возможны с применением *флуоресцирующего экрана*, который помещается в окуляре микроскопа в плоскости действительного изображения препарата, даваемого объективом.

В ультрафиолетовых лучах возможен микроспектральный анализ. Для этого микроскоп снабжают спектрографом.

В заключение следует отметить, что ультрафиолетовый микроскоп позволяет возбуждать флуоресценцию препарата как длинноволновыми, так и коротковолновыми ультрафиолетовыми лучами.

Метод инфракрасной микроскопии

Инфракрасные лучи меньше рассеиваются, чем видимые. Непрозрачные объекты, которые трудно или нельзя рассматривать в видимом свете, можно сделать видимыми в инфракрасных лучах при помощи электронно-оптического преобразователя. Это позволяет изучать объекты с хитиновым покровом, гифы и споры грибов, семена растений и т. д.

Т. А. Борщева с соавторами в 1971 г. предложили использовать инфракрасные лучи для диагностики повреждений вредителями зерновок пшеницы, в частности вредной черепашкой.

Для работы методом инфракрасной микроскопии к обычному микроскопу необходима инфракрасная насадка НИК (рис. 23). Ее устанавливают вместо тубуса. Благодаря электронно-оптическому преобразователю невидимое инфракрасное изображение превращается в видимое. В комплект входят поляризаторы, один из которых помещают на откидное кольцо конденсора, а другой — сверху на объектив в насадке.

При просмотре под микроскопом неповрежденное зерно выглядит прозрачным, а поврежденное — имеет темные пятна различной конфигурации. Метод позволяет выявить сортовые различия, а также повреждение зерна вредителями (тлями, трипсами), поражение болезнями. Используются в работе модели НИК-1, НИК-2.

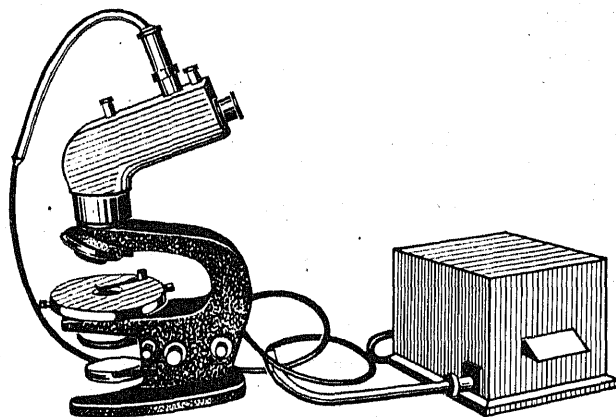


Рис. 23. Инфракрасная насадка с биологическим микроскопом. По Т. А. Борщевой с соавт.

Электронная микроскопия

В отличие от рассмотренных выше типов светового микроскопа электронный микроскоп основан не на световых, а на электронных лучах. Длину волны движущихся электронов (λ) вычисляют по формуле

$$\lambda = \frac{h}{mv}, \quad (12)$$

где h — постоянная Планка, $h = (6,62377 + 0,00018) 10^{-28}$ мкДж·с; m — масса; v — скорость.

Из формулы видно, что длина волны электрона обратно пропорциональна его массе и скорости. Так, электроны, ускоренные напряжением 100 В, имеют длину волны 12,3 нм, при напряжении 50 000 В — всего 0,5 нм. Таким образом, при более высоком напряжении длина волны электрона уменьшается.

Сравнивая длины волн обычного света (40 000—80 000 нм) и электронов, можно видеть, что они сильно отличаются. Из формулы (1) (см. с. 9) видно, что, используя электроны, имеющие короткую длину волны, можно резко повысить разрешающую способность микроскопа. В световом микроскопе разрешающее расстояние составляет 0,24 мкм, а в электронном микроскопе — 50—100 нм. Это одно из самых существенных отличий электронного микроскопа от светового.

Рассмотрим схему электронного микроскопа (рис. 24).

Источником электронов в электронном микроскопе просвечивающего типа служит вольфрамовая проволока, которую сильно нагревают электрическим током. От катода K электроны устремляются к аноду A , в центре которого есть отверстие. Разность потенциалов между катодом и анодом составляет несколько тысяч вольт. Благодаря огромному напряже-

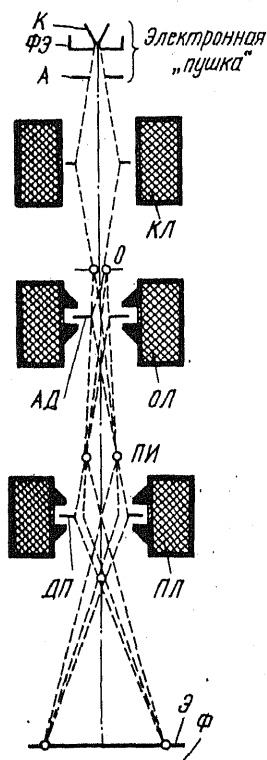


Рис. 24. Принцип действия магнитного просвечивающего электронного микроскопа:

K — катод; $\Phi Э$ — фокусирующий электрод; A — анод; $КЛ$ — конденсорная линза; O — объект; $ОЛ$ — объективная линза; $ПИ$ — плоскость промежуточного изображения; $ПЛ$ — проекционная линза; $ДП$ — диафрагма поля зрения; $Э$ — плоскость второго увеличенного изображения. По Ю. М. Кушнису.

нию электроны приобретают большую скорость. Эту часть микроскопа называют *электронной пушкой*.

Прямолинейное распространение электронов возможно только в безвоздушном пространстве. В микроскопе это достигается при помощи вакуумной системы. Из пушки электроны попадают в магнитное поле конденсорной линзы *КЛ*, которая сужает поток электронов в узкий пучок. Достигая объекта *О*, электроны рассеиваются и попадают в объективную линзу *ОЛ*, которая создает первичное увеличенное изображение. Это изображение объекта еще раз увеличивается проекционной линзой *ПЛ*. Она образует конечное изображение, видимое на флуоресцирующем экране (*Э*) микроскопа и фиксируемое на фотопластинке *Ф*. От рассеяния и поглощения электронов объектом зависит контраст изображения.

Такова упрощенная схема электронного микроскопа. По сравнению со световым в нем источник света заменен потоком электронов, движением которых управляют электрические и магнитные линзы, а изображение можно видеть только благодаря флуоресцирующему экрану.

Наиболее распространены просвечивающие и сканирующие (растровые) электронные микроскопы. В просвечивающих объект пронизывает пучок электронов, создающий на экране изображение (рис. 25). В сканирующих микроскопах изображение создают вторичные электроны, испускаемые поверхностью объекта при облучении ее пучком первичных электронов. Выше рассмотрена схема наиболее распространенного микроскопа просвечивающего типа, который требует применения сложной заливки объектов в специальные смолы и ультратонких срезов, но обладает высокой разрешающей способностью.

Первый отечественный электронный микроскоп был построен в 1940 г. в лаборатории А. А. Лебедева Государственного оптического института. За небольшой отрезок времени при помощи электронного микроскопа ученые получили новые данные о тончайшей структуре и форме уже известных органелл, открыли новые структуры в клетке, проникли в мир вирусов и молекул органических веществ.

Метод электронной микроскопии не позволяет вести наблюдения за живыми объектами.

В последние годы в практике исследований поверхностных структур клеток и тканей стали применять сканирующие электронные микроскопы. Принцип устройства такого микроскопа был предложен еще в 1935 г. Кнолем. Однако промышленные модели появились лишь во второй половине 60-х годов текущего столетия.

В последнее время созданы зарубежные и отечественные модели сканирующего (СЭМ), или растрового, электронного микроскопа (РЭМ).

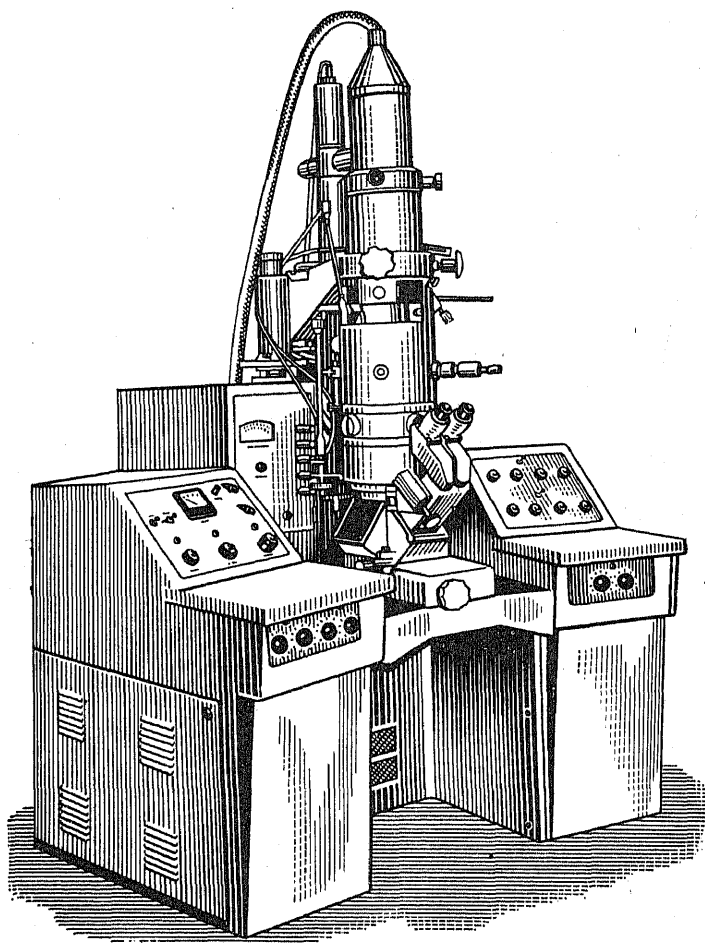


Рис. 25. Электронный микроскоп просвечивающего типа.

Микроскопы этого типа дают возможность изучать сравнительно крупные объекты: до 12 мм в диаметре и 3 мм толщиной. Полезное увеличение имеет широкий интервал: от 20 до 40 000. Глубина резкости изображения в 300—500 раз выше, чем у светового микроскопа. Разрешающая способность 2000—2500 нм, есть модели и с еще более высоким разрешением — порядка 500—1000 нм. Стереоскопический эффект изображения позволяет получить дополнительную информацию. Фотографирование объекта осуществляется с экрана кинескопа.

Особенно привлекает исследователей в этом типе электронного микроскопа то, что нет необходимости подвергать объекты для исследования сложной обработке: не требуются окрашивание, проводка через серию жидкостей, изготовление ультратонких срезов, которые необходимы для электронного микроскопа просвечивающего типа. Объект обычно приклеивают к объектодержателю так, чтобы его толщина была меньше рабочего расстояния (между линзой и объектом), равного 5 мм. Сканирующий электронный микроскоп расширяет возможности изучения непрозрачных объектов, давая интересную информацию о поверхностных структурах. Так, его можно применять для исследования пыльцы, спор грибов, одноклеточных организмов, микро- и мегаспор, волосков, устьиц, желёз и т. д.

Наша промышленность выпускает растровые электронные микроскопы модели РЭМ-200.

СПОСОБЫ ПОДГОТОВКИ К ИССЛЕДОВАНИЮ И МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ КЛЕТКИ

Ознакомившись с микроскопом и методами наблюдения, кратко остановимся на методах исследования, при помощи которых накапливают данные о строении, функции, химическом составе клетки и ее структурных компонентов. К ним относятся: прижизненные наблюдения, изучение фиксированных и окрашенных клеток и тканей, высушенных замороженных, или лиофилизированных, объектов, цитохимия, дифференциальное центрифугирование, автордиография, культура клеток и тканей, микроургия и др.

Почти каждый из перечисленных методов исследования непременно сопряжен с одним или несколькими методами наблюдения. Исследователь для получения информации о протекающих процессах на уровне клетки должен быть хорошо знаком с разными способами исследования клетки, которые неравноценны между собой, и каждый имеет свои достоинства и недостатки.

Прижизненные наблюдения объектов очень распространены в цитофизиологии. Пыльцевые зерна, пыльцевые трубки, рыльца, столбики, волоски тычиночных нитей нередко для изучения морфологии клетки, прижизненной кислотности, окислительно-восстановительного потенциала, степени дисперсности коллоидов протопласта, жизнеспособности, проницаемости и т. д. приходится смотреть под микроскопом в капле жидкости. Метод используют при просмотре искусственных культур клеток растений, грибов, бактерий. Вследствие низких показателей преломления содержимого живой клетки прижизненные наблюдения часто проводят на темном поле, в фазовом контрасте, поляризованном свете, флуоресцентным методом.

Препараты с живыми объектами недолговечны, а использование при работе с ними красителей ограничено вследствие их токсичности. Такие красители, как янус зеленый, нейтральный красный, метиленовый синий и другие, применяют для окрашивания живых объектов в слабой концентрации (от 10^{-4} до 10^{-5}) и обрабатывают ими ткани всего несколько минут. Специальные красители — флуорохромы — применяют для изучения живых объектов в люминесцентном микроскопе. Для прижизненных наблюдений используют следующие среды: воду, раствор сахарозы, вазелиновое, парафиновое, силиконовые (ВИЖ-94а, полисилан) масла и др.

В 1970 г. И. Д. Романов наблюдал движение цитоплазмы, сочетая прижизненные наблюдения с методом фазового контраста. Таким образом он исследовал пыльцевые зерна пшеницы, ржи, овса от момента обособления пыльцевых зерен до образования крахмала, что совпадает с периодом спермиогенеза, используя в качестве среды 5%-ный раствор сахарозы.

Фиксация с последующим окрашиванием клеток и тканей — один из наиболее распространенных способов подготовки объектов к исследованию в цитологии и эмбриологии. Под действием химических фиксаторов (этиловый спирт, формалин, уксусная кислота и др.) в клетке прекращаются жизненные процессы, а ее химические компоненты осаждаются. После фиксации объект промывают. Дальнейшая обработка зависит от типа приготовления препарата. Можно окрасить материал сразу для изготовления временного препарата. Для получения тонких срезов толщиной в несколько микрометров объект обезвоживают, заключают в парафин и режут на микротоме. Срезы наклеивают на предметные стекла, освобождают от парафина и окрашивают. Красители подбирают так, чтобы повысить контрастность изображения отдельных структур, а в ряде случаев и выявить их химический состав, например ДНК, РНК, белки и др. Точное содержание химических веществ определяют на приборе — *цитофотометре*.

При цитохимических исследованиях приходится считаться с тем, что химические фиксаторы могут вызывать *артефакты*, т. е. изменения в клетках, вызванные тем или иным фактором. Чтобы избежать этого, используют метод высушивания замороженных объектов, в процессе которого химические компоненты клетки не осаждаются. Кусочки ткани толщиной около 0,1—1 мм и площадью 1 мм² замораживают в изопентане, охлаждаемом жидким азотом до минус 170°C. Замороженный объект переносят в сушильный аппарат, где при низкой температуре (минус 30—40°C) в вакууме из него удаляют воду. Высушенный материал затем готовят для микроскопического исследования. В нем хорошо сохраняются нуклеиновые кислоты, белки, липиды, некоторые полисахариды и другие соединения

и не происходит нежелательного перераспределения вещества.

Дифференциальное центрифугирование применяют для изучения химического состава ядер, митохондрий и других структур. В этом случае объект измельчают с использованием сахарозы в специальном приборе — *гомогенизаторе*. Полученный гомогенат путем дробного центрифугирования разделяют по плотности на фракции, состоящие из определенных, но изолированных клеточных структур. При сравнительно небольших ускорениях на центрифуге из гомогената осаждают клеточные ядра. При значительно больших ускорениях центрифугированием надосадочной жидкости выделяют митохондрии, а затем рибосомы и другие структуры.

Метод автордиографии применяют для изучения локализации и синтеза нуклеиновых кислот в клеточных структурах с использованием меченых соединений и определения продолжительности митотического цикла. При работе этим методом используют изотопы, при распаде которых образуются электроны с малым запасом энергии.

Для регистрации α - и β -излучений необходимы специальные фотоэмульсии, при контакте которых с меченым объектом на них остаются следы электронов. Так изотоп подает сигнал о своем местонахождении, и это позволяет проследить движение, перераспределение и превращения определенных веществ клетки. Разработаны способы количественного анализа радиоавтографов, что расширяет возможности метода.

Метод культуры клеток и тканей используют при подготовке к исследованию живых клеток в условиях, благоприятных для их жизнедеятельности и размножения. Небольшие кусочки тканей, органы или отдельные клетки можно культивировать в стерильных условиях на питательной среде *in vitro* при оптимальной для них температуре. Культуру периодически переносят в свежую питательную среду для длительного сохранения жизнеспособности. Однослойные культуры клеток удобны для прижизненных наблюдений методом фазового контраста и киносъемки. Так можно проследить весь жизненный цикл клеток. Из отдельных клеток можно вырастить целые растения. В последние годы интерес к этому методу возрос в связи с возможностью использовать его при изучении генетики соматических клеток: в биотехнологии — для выращивания зародышей на искусственной питательной среде, при клеточной инженерии, позволяющей получать парасексуальные гибриды путем слияния изолированных протопластов разных видов растений и гаплоидов из клеток пыльников.

Нередко возникает необходимость вмешаться во внутренние процессы, протекающие в клетке. Это достигается при помощи тонкого метода исследования — *микрургии*. Она позволяет проводить трансплантацию ядер из клетки в клетку, определять

прижизненную кислотность отдельных структур, измерять биотоки, температуру и т. д. Для выполнения подобных операций необходимы прибор *микроманипулятор* ММ-1 с микроскопом и набор стеклянных игл, пипеток, петель, электродов и т. д.

В цитологии микрогигиеские операции проводят обычно на клеточном уровне, в эмбриологии — на зародышах или их органах. Для микрогигии объект заключают в стеклянную камеру, заполненную определенной средой, и все операции выполняют под микроскопом.

В зависимости от цели и объекта исследования можно использовать один или несколько указанных выше методов. Так, в кариологии чаще работают методом фиксации с последующим окрашиванием тканей и клеток. Цитофизиологи предпочитают прижизненные наблюдения, а в цитохимии сочетают фиксацию, лиофилизацию, автордиографию, прижизненные наблюдения, окрашивание и др.

Совокупность приемов, направленных на выявление локализации определенных веществ в тканях и клетках, получила название *микроскопической гистохимии*. В последние годы для изучения химии клеточных структур все чаще используют абсорбционные оптические методы, которые в совокупности называют *цитофотометрией*. Она делится на ультрафиолетовую и видимую. Последняя базируется на применении специфических красителей.

Для фотометрирования используют микрофотометрические насадки (ФМЭЛ-1, ФМЭП-1), цитофотометры (МЦФВ-1, МЦФУ-1), универсальные микроскопы-фотометры, микроспектрофотометры. *Цитофотометр* состоит из микроскопа и микропроектора. Анализ препарата ведут в монохроматическом свете с длиной волны, лежащей в пределах поглощения исследуемого вещества. Методы цитофотометрии позволяют измерить содержание поглощающих веществ в клетке и ее структурах.

ПОСТОЯННЫЕ МИКРОТОМНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Исследование микротомных препаратов сыграло огромную роль в развитии цитологии и эмбриологии растений. Многие отечественные ученые, начиная с С. Г. Навашина, сделали очень ценные наблюдения на постоянных микротомных препаратах. Эти препараты являются прекрасным демонстрационным материалом и могут храниться долгие годы. На тонких срезах толщиной 10—22 мкм можно изучать митоз и мейоз, подсчитывать число хромосом, наблюдать проникновение пыльцевых трубок в зародышевый мешок, двойное оплодотворение, развитие зародыша, эндосперма и т. д.

Техника приготовления окрашенных микротомных препаратов для растений введена В. И. Беляевым. Объекты, предназна-

ченные для таких исследований, претерпевают сложную обработку. Ниже приведена последовательность обработки исследуемого материала по Юрцеву.

1. Подготовка материала к фиксации.
2. Фиксирование материала водным (24 ч) или спиртовым фиксатором (30 мин — 12 ч).
3. Промывка фиксированного материала:

<i>после водных фиксаторов</i>	<i>после спиртовых фиксаторов</i>
в проточной воде 1—3 ч	в трех сосудах с 80%-м раствором этилового спирта по 1—2 ч в каждом (запах уксусной кислоты должен исчезнуть)

4. Полное обезвоживание промытого материала:

<i>при водных фиксаторах</i> в растворах этилового спирта:	<i>при спиртовых фиксаторах</i> в растворах этилового спирта:
20%-й	96%-й
40%-й	96%-й
60%-й	100%-й
80%-й (можно оставить надолго)	100%-й
96%-й	} по 1 ч в каждом
96%-й	
100%-й	
100%-й	
100%-й	

5. Пропитывание материала растворителями парафина (хлороформом, ксилолом или бензолом):

3 ч. абсолютного этилового спирта + 1 ч. хлороформа (или ксилола)	} по 1 ч в каждом
2 ч. абсолютного этилового спирта + 2 ч. хлороформа (или ксилола)	
1 ч. абсолютного этилового спирта + 3 ч. хлороформа (или ксилола)	
хлороформ 1 (или ксилол 1)	
хлороформ 2 (или ксилол 2)	

6. Пропитывание материала парафином (замещение промежуточной жидкости парафином): в хлороформ (или ксилол) добавляют парафин и эту смесь помещают в термостат при температуре 56—57°C до полного испарения хлороформа (или ксилола) и замещения его в материале парафином в течение 3—6 сут.

7. Заливка материала в парафин (материал, залитый в парафин, можно хранить очень долго).

8. Изготовление блоков из материала, пропитанного парафином.

9. Получение срезов при помощи микротомы.

10. Наклейка срезов на предметные стекла.

11. Просушивание препарата при 40—45°C (стекла со срезами можно хранить очень долго, если оберегать их от пыли и высокой температуры).

12. Удаление парафина из срезов ксилолом.

13. Удаление ксилола из срезов спиртом.

14. Удаление спирта из срезов дистиллированной водой.

15. Окрашивание препаратов (иногда с предварительным протравливанием) и дифференцировка.

16. Обезвоживание окрашенных срезов 96%-м раствором и 100%-м этиловым спиртом.

17. Замещение спирта в срезах на ксилол (одновременно происходит осветление срезов ксилолом).

18. Заключение срезов в канадский бальзам.

19. Просушивание препаратов и подчистка.

20. Эtiquетирование препаратов.

21. Изучение препаратов под микроскопом.

Подбор объектов для исследования и подготовка их к фиксации

Для цитологических и эмбриологических исследований очень важно определить, какие органы и ткани растения необходимы для работы. Например, митоз можно наблюдать в меристемах молодых быстрорастущих корней растений, в главных корнях проросших семян, в конусах нарастания стебля и др. Обычно для изучения митоза и подсчета числа хромосом в соматических тканях растения предпочитают работать с молодыми корнями, так как в них непосредственно под чехликом находится зона активного деления клеток (конус нарастания корня) и фигуры деления здесь удобно ориентированы.

Для изучения мейоза и подсчета числа хромосом во время деления материнских клеток микроспор используют у растений семейства мятликовые — молодые колосья за несколько дней до выколашивания, мотыльковые и некоторые другие — небольшие бутоны до приобретения ими окраски или непосредственно молодые пыльники. Оплодотворение и различные этапы эмбриогенеза наблюдают в опыленных цветках через определенные промежутки времени после нанесения пыльцы на рыльце.

Имея необходимые объекты для исследования, нужно обратить серьезное внимание на их подготовку к фиксации. От этого во многом зависит достоверность эксперимента. Например, чтобы наблюдать деление клеток в кончиках молодых корней, очень важно обеспечить соответствующую температуру воздуха, влажность среды, а в полевых условиях — еще почвенное питание и освещение, т. е. создать оптимальные условия для нормального роста и развития растений. Отсутствие необходимых условий тормозит рост растений и деление клеток.

В специальных исследованиях иногда необходимо не только наблюдать деление клеток в конусе нарастания корня, но и определить время наступления первых митозов. Установлено, что при одной и той же температуре (23—25°C) первые митозы у проросших семян различных видов растений наблюдаются в корешках неодинаковой длины. Например, у скерды зеленой [*Crepis capillaris* (L.) Wallr.] они бывают в корешках длиной 2—3 мм, у бобов (*Vicia faba* L.) — 12—17, у мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) — 10—12 мм. Следовательно, при подготовке корней к фиксации следует обращать внимание на их длину.

Подмечено также, что число делящихся клеток в различные часы суток неодинаково. Это заставляет учитывать в ряде случаев периодичность митозов и проводить фиксацию материала в разное время с определенными интервалами в зависимости от объекта.

Как указывалось выше, для изучения митоза и подсчета числа хромосом можно брать проросшие семена и растения, выращенные в вазонах или непосредственно в полевых условиях. Если семян достаточно, их проращивают в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге. Чашки Петри с семенами помещают в термостат с температурой воздуха 23—25°C или в теплое место, например под лампу. Корни могут появиться через несколько суток, в течение которых необходимо следить за тем, чтобы фильтровальная бумага была влажной. В ряде случаев целесообразно менять температуру при проращивании семян (ночью 27°C, днем 0—2°C).

Фиксируют корни, когда длина их достигнет в зависимости от объекта 3—15 мм. Если нужно зафиксировать корни во время первых митозов, то их берут только определенной для данной культуры длины. Максимум митозов неодинаков в корнях разной длины. Так, у бобов он отмечен в корнях, достигших длины 1—1,5 см, у гороха — 1,5—2, у гречихи — 1—2, у ржи — 1,5 см и т. д. В некоторых случаях фиксируют не отдельно корни, а проросшие семена целиком, например у мелкосемянных культур — скерды зеленой, лука.

Растения, выращиваемые в небольших вазонах диаметром 10—12 см, лучше помещать на освещенное место в теплице. Почва в вазонах не должна быть плотной. Чтобы предотвратить высыхание и создать благоприятные условия для растущих корней, вазоны ставят в ящики с влажной почвой и систематически поливают. Через 2—3 недели после посева семян в вазоне на поверхности земляного кома появляются многочисленные молодые корни, которые отрезают ножницами и сразу помещают в фиксатор.

Иногда нужно зафиксировать корни растений, растущих в полевых условиях. В этом случае растения также нужно заранее подготовить, полить, удобрить навозом, подрыхлить. Подготов-

ленные экземпляры подкапывают с одной стороны, находят молодые корни и отрезают их ножницами. Фиксировать их лучше в тени во избежание преждевременной порчи обнаженных корней на солнце.

В ряде случаев возникает необходимость подсчитать число хромосом у растений, размножающихся луковицами, клубнями, черенками и т. д. Для этого черенки, листья, луковицы помещают в сосуд с водой или с искусственной питательной смесью, а клубни — в мокрый песок.

Для наблюдения процессов оплодотворения и формирования зародыша цветки заранее кастрируют, опыляют и фиксируют через определенные промежутки времени после нанесения пыльцы на рыльце. Для такого опыта важно обеспечить сравнимость результатов.

Специальная обработка объектов перед фиксацией

В некоторых случаях, когда хромосом много и они длинные, что затрудняет их изучение и подсчет, корни перед фиксацией обрабатывают специальными реактивами, например 8-оксихинолином, хлоралгидратом, колхицином, парадихлорбензолом, холодом. 8-оксихинолин применяют для предварительной обработки объекта или как составную часть фиксатора. В первом случае объект помещают на 3 ч в 0,002 М раствор 8-оксихинолина при температуре 10—14°C и после промывки в воде фиксируют. Эту методику в основном используют для приготовления временных препаратов. Однако она была испытана и на постоянных препаратах в лаборатории цитогенетики Ботанического института имени В. Л. Комарова. Для этого 0,58 г 8-оксихинолина растворяют в 200 см³ теплой дистиллированной воды. Водный раствор реактива готовят при температуре воды около 60°C. Оказалось, что предварительная обработка этим реактивом увеличивала толщину хромосом в 1,5 раза, не изменяя их длины. Первичные и вторичные перетяжки хромосом выступали резче. По данным Всесоюзного НИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова (ВНИИР), требуется обработка: лука — в течение 4 ч, ячменя — 3—4, картофеля — 2—3, вики — 5 ч при комнатной температуре.

Если для укорачивания хромосом применяют хлоралгидрат, то берут водный раствор этого реактива 0,3—1%-й концентрации. Корни погружают в него на 1 ч, затем столько же времени промывают в проточной воде. После этого их помещают во влажную камеру на 2—4 ч и фиксируют.

Нередко для остановки митозов объекты перед фиксацией обрабатывают слабым раствором колхицина. Например, корни скерды зеленой размером 2—3 мм за 2 ч до фиксации обрабатывают этим препаратом в концентрации 0,05%. Для пшеницы

и риса берут 0,1%-й раствор колхицина и выдерживают в нем соответственно 5 и 4 ч.

Другие зерновые культуры и картофель для приостановки митозов опускают в раствор колхицина 0,01%-й концентрации. Молодые листочки можно выдерживать в 0,2%-м растворе колхицина в течение 1—2 ч.

Для обработки корней иногда используют насыщенный раствор парадихлорбензола. Для этого 5—10 г кристаллического препарата растворяют в 500 мл дистиллированной воды и оставляют в закрытой посуде в термостате при температуре 60°C на 10—12 ч. Материал опускают в раствор на 2—3 ч при температуре 12—16°C, корни гороха при комнатной температуре — на 6 ч.

Для кардиологического анализа нередко действие колхицина сочетают с последующей обработкой смесью насыщенного раствора парадихлорбензола и 0,002 М 8-оксихинолина (1:1). При исследовании пшеницы берут насыщенный раствор монобромнафталина в воде и 0,1—0,01%-й раствор колхицина, кукурузы — 0,05%-й — колхицина и 0,5%-й — монобромнафталина. Экспозиция в обоих случаях — 4 ч (общее время).

Растворы колхицина, монобромнафталина и других веществ готовят в резиновых перчатках.

Хромосомы укорачиваются также, если перед фиксацией выдерживать чашки Петри с проросшими семенами в холодильнике при температуре 1—2°C в течение суток.

При изучении морфологии хромосом иногда объекты перед фиксацией обрабатывают одним из следующих способов:

в 2%-м растворе кумарина 2 ч при температуре 12—16°C;

в смеси кумарина и 8-оксихинолина (1:1) в течение 2 ч при 16°C.

Фиксаторы, их состав и использование

Фиксация материала, т.е. быстрое умерщвление клеток в специально подобранных растворах ядовитых реактивов, которые называются *фиксаторами*, прерывает тот или иной процесс в клетке, вызывая необратимые изменения. При этом коллоиды протопласта переходят в нерастворимое состояние.

Известно много фиксаторов, но каждый из них имеет определенное назначение. Очень важно выбрать такой фиксатор, который, убивая клетку, несильно искажает ее прижизненную структуру и отвечает целям исследования. Для цитологических и эмбриологических исследований обычно используют *ядерные фиксаторы* (фиксатор С. Г. Навашина, Карнуа и др.), хорошо фиксирующие ядро. Некоторые реактивы хорошо фиксируют митохондрии и пластиды (фиксатор Г. А. Левитского) и др.

Обычно фиксатор представляет собой смесь нескольких реактивов, каждый из которых редко используется для фиксации вследствие одностороннего действия. В состав этих смесей могут входить: ледяная уксусная кислота, хромовая кислота, формалин, хлороформ, осмиевая кислота, спирт и др.

Уксусная кислота ($\text{CH}_3\text{—COOH}$) — бесцветная жидкость с резким запахом. Хорошо смешивается с водой, спиртом, эфиром, хлороформом. Ледяная уксусная кислота имеет 99,8% основного вещества и при охлаждении образует кристаллическую массу. Эта кислота, быстро проникая в ткани, может вызывать их набухание, хорошо осаждает нуклеиновые кислоты. Кроме того, она хорошо сохраняет форму хромосом, но разрушает митохондрии и комплекс Гольджи. Уксусная кислота входит в состав многих ядерных фиксаторов, но может использоваться и самостоятельно. В последние годы ее нередко заменяют при фиксации пропионовой кислотой ($\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{—COOH}$), которая способствует лучшей фиксации и окрашиванию объектов.

Хромовую кислоту готовят растворением в воде хромового ангидрида CrO_3 — сильного окислителя, представляющего собой темноокрашенные кристаллы, очень гигроскопичные и легко растворимые в воде. Она проникает в объекты не очень быстро, коагулирует белки, сохраняет детали строения ядра, цитоплазмы, а также митохондрии и комплекс Гольджи. После фиксации хромовой кислотой объект необходимо тщательно промыть водой, иначе образуется осадок, мешающий окрашиванию тканей.

Осмиевая кислота представляет собой раствор сильно-го окислителя — тетраоксида осмия (OsO_4). Эта кислота медленно, а иногда и неравномерно проникает в объект. Однако она вызывает наименьшие изменения в структуре цитоплазмы и ядра. Ею можно фиксировать митохондрии, а из органических соединений — липоиды и жиры.

Формалин — водный раствор формальдегида (CH_2O), примерно 40%-й. Это вещество может образовывать осадки в тканях, так как содержит в виде примеси муравьиную кислоту. Чтобы избежать их появления, необходимо пользоваться нейтральным формалином. Для этого на дно темной бутылки с его концентрированным раствором насыпают мел. Иногда неразведенный формалин образует белый осадок, для растворения которого бутылку ставят в термостат при температуре 54—56°C на сутки.

Формалин используют как составную часть ядерных фиксаторов. Он сохраняет тонкую структуру цитоплазмы, митохондрий и комплекса Гольджи, фиксирует липоиды, жиры и жирные кислоты, придавая некоторую твердость тканям. После фиксации необходима тщательная промывка в воде. Подмечено, что

после фиксации объектов формалином и хромовой кислотой они плохо окрашиваются кармином.

В качестве составных частей фиксаторов нередко используют различные растворители: ацетон ($\text{CH}_3\text{—COCH}_3$), диоксан ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$), хлороформ (CHCl_3), петролейный эфир и спирты — этиловый, или этанол, — $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, изопропиловый, или пропанол-2, — $\text{CH}_3\text{—CH(OH)—CH}_3$ и др. Из них наиболее часто употребляют этиловый спирт. Он осаждает нуклеиновые кислоты, альбумины, глобулины, но растворяет липоиды. Благодаря нейтральной реакции применим для гистохимических исследований. Один этанол редко используют как фиксатор, так как он вызывает искажение структур клетки, сильное сморщивание и затверждение тканей.

Все растворы фиксаторов готовят или на спирту (спиртовые фиксаторы), или на дистиллированной воде (водные фиксаторы). Спиртовые фиксаторы быстро проникают в ткани, и материал в них выдерживают от 30 мин до 12 ч. Водные фиксаторы значительно медленнее проникают в ткани, поэтому в них объекты должны находиться не менее суток, а иногда дольше. Спиртовые фиксаторы грубее по своему действию, чем водные, но они и более стойкие, их можно готовить заранее в отличие от водных.

Фиксатор выбирают в зависимости от цели и объекта исследования. На первых этапах работы можно испытать несколько видов, чтобы выбрать наиболее надежный. Мелкие бутоны и нежные корни хорошо фиксируются в водных фиксаторах, крупные бутоны и толстые корни — в спиртовых. Трудносмачиваемые объекты (пыльники, почки и др.) для успешной фиксации можно обработать сначала спиртовым препаратом (несколько минут), а затем водным. Хлорофилл, сахара, жиры при фиксации обычно извлекаются из клеток, митохондрии — разрушаются, поэтому не обнаруживаются при изучении объектов под микроскопом. Ниже приведен состав некоторых ядерных фиксаторов.

Фиксатор С. Г. Навашина (10:4:1)* используют для фиксации корней (не слишком плотных и толстых) и мелких эмбриологических объектов. Продолжительность фиксации 24 ч в темноте.

Состав: хромовая кислота 1%-й раствор — 10 ч.; формалин — 16%-й — 4 ч.; ледяная уксусная кислота — 1 ч.

Фиксатор готовят перед употреблением, так как он быстро портится. Этот фиксатор относится к группе водных, он действует очень мягко и хорошо сохраняет структуру хромосом.

Фиксатор Карнуа (6:3:1) широко используют в цитологической и эмбриологической практике для изготовления по-

* В скобках дано условное обозначение соотношения компонентов фиксирующей смеси.

стоянных микротомных и давленных препаратов. Продолжительность фиксации от 2 до 12 ч.

Состав: абсолютный этиловый спирт или его 96%-й раствор— 6 ч.; хлороформ— 3 ч.; ледяная уксусная кислота— 1 ч.

Относится к группе спиртовых, быстро проникает почти в любые объекты, действует не так мягко, как фиксатор Навашина.

«Уксусный алкоголь», или фиксатор Кларка (3:1), широко применяют в цитологических и эмбриологических исследованиях, особенно для изготовления давленных препаратов. Материал выдерживают в фиксаторе от 2 до 12 ч, а иногда и хранят в нем при 0—3°C.

Состав: абсолютный этиловый спирт или его 96%-й раствор— 3 ч.; ледяная уксусная кислота— 1 ч.

Действует подобно фиксатору Карнуа. Уксусную кислоту иногда заменяют пропионовой. На основе последней разработан состав нескольких фиксаторов для растительных объектов:

пропионовая кислота— 1 ч., 96%-й раствор этилового спирта— 3 ч.;

пропионовая кислота— 100 мл, 96%-й раствор этилового спирта— 100 мл, гидроксид железа— 0,4 г (перед тем как поместить объект в этот фиксатор, на каждые 10 мл смеси добавляют несколько капель кармина);

пропионовая кислота— 1 ч., хлороформ— 4 ч., абсолютный этиловый спирт— 3 ч.;

формалин— 1 ч., 96%-й раствор этилового спирта— 15 ч., пропионовая кислота— 2 ч. (рассчитан на 1—2 ч действия и применяется для растительных и животных объектов).

Фиксатор Флемминга используют для мелких объектов.

Состав: хромовая кислота, 1%-й раствор— 25 мл; осмиевая кислота, 2%-й— 5 мл; ледяная уксусная кислота— 10 мл; вода— 60 мл.

Материал фиксируют не менее суток, а затем промывают в воде.

Фиксатор Шампи. Продолжительность фиксации 24 ч.

Состав: хромовая кислота, 1%-й раствор— 35 мл; бихромат калия, 3%-й— 35 мл; осмиевая кислота, 2%-й— 15 мл; ледяная уксусная кислота— 2—4 капли.

Фиксатор Я. С. Модилевского (9:2:2:2) используют в эмбриологической практике. Продолжительность фиксации 24 ч.

Состав: хромовая кислота, 1%-й раствор— 9 ч.; формалин, 16%-й— 2 ч.; бихромат калия, 5%-й раствор— 2 ч.; уксусная кислота, 5%-й раствор— 2 ч.

Фиксатор водный, мягкого действия.

Фиксатор Чемберлена (почти универсальный) применяют для эмбриологических и анатомических исследований,

особенно крупных объектов. Продолжительность фиксации 16 ч. В этом фиксаторе материал можно хранить.

Состав: этиловый спирт, 50—70%-й раствор — 90 ч.; формалин — 5 ч.; ледяная уксусная кислота — 5 ч. По действию занимает промежуточное положение между фиксаторами Карнуа и Навашина.

Фиксатор Батталья используют в цитологической практике в двух соотношениях 1—5:1:1:1 и 2—5:5:1:1 (во втором объекты можно хранить). Продолжительность обработки 5 мин.

Состав фиксатора 1: этиловый спирт, 96%-й раствор — 5 ч.; хлороформ — 1 ч.; формалин, 16%-й — 1 ч.; ледяная уксусная кислота — 1 ч.

Состав фиксатора 2: этиловый спирт, 96%-й раствор — 5 ч.; хлороформ — 5 ч.; формалин, 16%-й — 1 ч.; ледяная уксусная кислота — 1 ч.

Фиксатор Ньюкомера (6:3:1:1:1) в последние годы применяют для изучения мейоза у зерновых культур на давленных препаратах. Молодые колосья фиксируют в течение суток при комнатной температуре, затем заливают свежим фиксатором и хранят в холодильнике до анализа. Пыльники окрашивают ацетокармином. Фиксатор используют и для изучения корней.

Состав: изопропиловый спирт — 6 ч.; пропионовая кислота — 3 ч.; диоксан — 1 ч.; петролейный эфир — 1 ч.; ацетон — 1 ч.

Ледяная уксусная кислота. Продолжительность обработки 12—72 ч в условиях холодильника. После фиксации промывают 96%-ным раствором этилового спирта.

Фиксатор В. Я. Бродского, или ФСУ (3:1:0,3). Используют для цитохимических исследований, в нем хорошо сохраняется РНК.

Состав: формалин — 3 ч.; абсолютный спирт этиловый — 1 ч.; уксусная кислота — 0,3 ч.

Продолжительность обработки корней 1—1,5 ч, максимум — 6 ч. После фиксации материал необходимо промыть водой в течение 12 ч или в трех-четырех сменах 70%-го раствора этилового спирта.

Фиксатор Н. Т. Кахидзе: 100 мл 75%-го раствора этилового спирта + 5 г сахарозы. Используется для изучения рН ИЭТ (изoeлектрическая точка).

Фиксатор Г. А. Левитского используют при изучении митохондрий. Он состоит из трех растворов, в которые последовательно помещают материал.

1-й раствор. Хромовая кислота, 1%-й раствор — 3 мл; формалин, 4%-й — 17 мл. Продолжительность фиксации — двое суток.

2-й раствор. Хромовая кислота, 1%-й раствор — 15 мл; осмиевая кислота, 2%-й — 2 мл; вода — 18 мл. Продолжительность фиксации — 6 сут.

3-й раствор. Хромовая кислота, 1%-й раствор — 15 мл; осмиевая кислота, 2%-й — 4 мл. Продолжительность фиксации — 9 сут, затем материал промывают в течение суток в воде.

Фиксатор Рего также применяют для наблюдения хромосом.

Состав: диокромат калия, 3%-й раствор — 80 мл; формалин — 20 мл.

Зафиксированный материал выдерживают в темноте четверо суток, заменяя ежедневно фиксатор свежим. Затем на 8—13 сут материал переносят в 3%-ный раствор дихромата калия, после чего в течение суток промывают в воде.

Смесь по Немецу используют для фиксации плазмодесм.

Состав: пикриновая кислота (насыщенный раствор готовят на холоде) — 100 мл; ледяная уксусная кислота — 70,5 мл; концентрированная серная кислота — 0,5 мл.

Материал фиксируют 24 ч, а затем промывают 60%-м раствором этилового спирта. Окрашивают железным гематоксилином.

Формалиновый спирт также применяют для фиксации плазмодесм.

Состав: спирт этиловый, 70%-й — 50 ч.; формалин — 10 ч. Через сутки после фиксации материал промывают 70%-м раствором этилового спирта и хранят в 96%-м его растворе.

Смесь Гаммалунда обладает хорошими консервирующими свойствами для хлоропластов.

Состав: медный купорос (концентрированный раствор) — 15 ч.; формалин — 1 ч.; вода — 5 ч. Материал выдерживают в растворе 1—2 недели, затем переносят в слабый раствор формалина (на 1 л воды 50 мл формалина).

Фиксация

При подготовке к фиксации и в процессе ее выполнения необходимо соблюдать некоторые общие правила:

подобранный фиксатор должен соответствовать цели исследования; инструменты подбирают заранее (рис. 26);

объем фиксирующей жидкости должен значительно (в 50—100 раз) превышать объем материала;

фиксируют только свежие корни и бутоны, стараясь это делать на месте выращивания растений. Чтобы уберечь обнаженные корни от действия лучей солнца, лучше проводить фиксацию в тени;

крупные объекты, например корзинки сложноцветных, перед фиксацией разрезают на несколько частей, удаляя ненужные органы (листья, чашелистики, ости и т. д.), мешающие пропитыванию материала. Во время фиксации ножницами отрезают

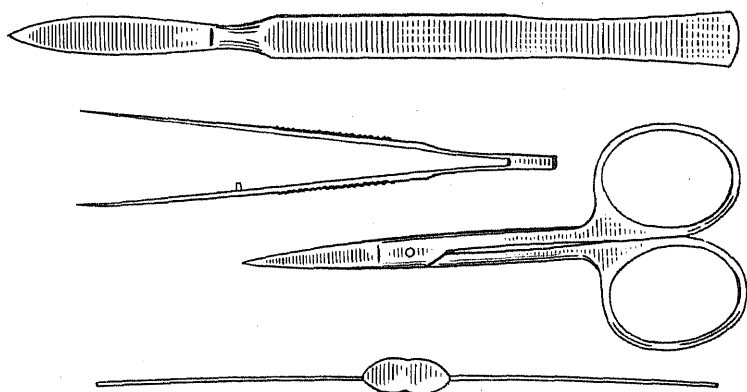


Рис. 26. Зонд, ножницы, пинцет, скальпель.

кончики корней длиной 6—7 мм и сразу помещают в фиксирующую жидкость. Бутоны чаще фиксируют целиком, колосья предварительно разбирают на колоски, но иногда соцветия также фиксируют целиком;

время фиксации в течение суток определяют в каждом конкретном случае. Корни лучше фиксировать в те часы, когда наблюдается максимум митозов.

Правильная организация всей подготовительной работы предусматривает некоторую последовательность операций, обеспечивающую сравнимость изучаемых вариантов и сокращающую до минимума потери времени на непредусмотренные мероприятия.

Рассмотрим последовательность работы при фиксации корней.

1. Чтобы обеспечить нормальное деление клеток в корнях, вазоны с растениями накануне и за 1—2 ч до фиксации обильно поливают и ставят в теплое место с температурой воздуха 20—25°C. Чашки Петри с проросшими семенами держат в термостате при температуре 24—25°C. За 1—2 ч до фиксации их также поливают, чтобы корни были свежими.

2. Заранее готовят плоскодонные пробирки или флаконы из-под пенициллина с корковыми пробками и этикетки из плотной бумаги. Пробирки обычно используют с полезным объемом не менее 10 см³. При фиксации колосьев применяют плоскодонные пробирки большего объема, так чтобы в каждую из них можно было поместить несколько колосьев одного варианта.

Для этикеток берут белую плотную бумагу. Пергаментная бумага и калька для этих целей не подходят. Размер этикеток 1—1,3×3,5—4 см. На них обычным карандашом аккуратно пишут номер фиксации по журналу регистрации фиксаций, дату

и час обработки, название объекта (например, «корни *Triticum durum*»), сокращенное название фиксатора (Ф. К. — фиксатор Карнуа). Этикетка в пробирке должна соответствовать этикетке в вазоне, в поле или чашке Петри. Особенно важно отметить вариант исследования.

3. В журнале регистрации фиксаций записывают те же сведения об объекте и варианте исследования, которые имеются на этикетке в вазоне, в поле или чашке Петри. Кроме того, указывают цель работы и те данные, которые будут необходимы при обработке результатов научных исследований, например вид специальной обработки корней перед фиксацией, число корней, особенности растения, метеорологические условия и др.

4. Подготовленные чистые пробирки с вложенными в них этикетками раскладывают по вариантам исследования около соответствующих растений или чашек Петри.

5. Непосредственно перед фиксацией готовят смесь Навашина. Для приготовления 1%-ного раствора хромовой кислоты берут 1 г хромового ангидрида и растворяют в дистиллированной воде, доводя объем до 100 мл.

16%-й раствор формалина готовят так: берут 16 мл 40%-го (неразведенного) формалина и доводят дистиллированной водой до 40 мл.

Перед употреблением смешивают 10 ч. 1%-го раствора хромовой кислоты, 4 ч. 16%-го раствора формалина и 1 ч. ледяной уксусной кислоты.

В пробирку наливают 7—10 мл готового фиксатора. Устанавливают ее вертикально без пробки в специальную подставку или небольшой стаканчик, на дно которого положена вата. Сверив этикетки, начинают фиксировать. Затем пробирки переносят в темное место, чтобы фиксатор не разлагался на свету.

6. Растения из вазонов, перевернув последние вверх дном, осторожно выбивают. При этом растение с комом земли держат в левой руке. Ножницами отрезают кончики молодых корней. Быстро помещают их в фиксатор и погружают в него стеклянной палочкой или встряхиванием пробирки. Зафиксировав достаточное число корней, сосуд с ними нужно поместить на 2—3 мин под колокол воздушного насоса, чтобы избавиться от пузырьков воздуха и облегчить проникновение фиксатора. Можно сделать и так: открытые пробирки с материалом, находящимся в фиксаторе Навашина, поместить в эксикатор, соединенный с водоструйным насосом. Это также ускоряет фиксацию.

Проросшие семена по одному вынимают пинцетом из бактериологических чашек, отрезают кончики корней и фиксируют.

Такая же последовательность работы соблюдается при фиксации эмбриологического материала. В этом случае при необходимости осуществляют кастрацию цветков и опыление.

Эмбриологический материал обычно фиксируют через определенные промежутки времени после нанесения пыльцы на рыльце (так называемая *темпоральная фиксация*). Для этого составляют график фиксаций в течение одних или нескольких суток, в зависимости от цели исследования. Чтобы ускорить проникновение фиксирующей смеси в крупные объекты, применяют метод вакуум-инфильтрации. Для этого собирают несложную установку, состоящую из эксикатора с краном, вакуумной резиновой трубки, тройника с краном и вакуумного насоса системы Комовского.

Продолжительность обработки зависит от состава фиксатора и объекта. Иногда возникает необходимость заменить фиксатор свежим. Например, фиксатор Навашина в летнее время быстро портится, что легко определить по внешнему виду жидкости. В этом случае корни или бутоны заливают свежей смесью. Хранить материал в фиксаторе можно лишь в отдельных случаях.

Промывание и обезвоживание

Промывание. При использовании наиболее распространенных фиксаторов (Карнуа, Навашина) материал через определенное время промывают, чтобы полностью удалить остатки фиксатора. После водных фиксаторов его промывают в проточной воде 1—3 ч, иногда дольше. Для этого объект вместе с этикеткой переносят из пробирок в марлевые мешочки, которые перевязывают суровыми нитками, и помещают в высокий стеклянный или фарфоровый стакан с воронкой, наполненный водой. Все это ставят под кран с проточной водой. Описанный способ промывки довольно прост и легко выполним, если в лаборатории нет специальных приборов. В летнее время материал промывают 1—2 ч, в зимнее — 2—3 ч. Более 3—4 ч промывать не рекомендуется, так как хромосомы после этого хуже окрашиваются, а края их оказываются как бы разъеденными.

Обезвоживание. Промыв материал в воде, его частично обезвоживают в этиловом спирте. Чтобы избежать сморщивания тканей, обезвоживание ведут постепенно, используя серии растворов спирта возрастающей концентрации. Марлевые мешочки вынимают по одному из стакана с водой и развязывают. Корни или бутоны вместе с этикеткой осторожно, но быстро, чтобы материал не подсох, переносят в пробирки с 20%-м раствором спирта, который затем заменяют 40, 60 и 80%-ми его растворами. В каждой из пробирок материал находится по 30 мин. В 80%-м растворе спирта его можно хранить длительное время. Для этого пробирки с корковыми пробками опускают концами в расплавленный парафин, чтобы спирт не улетучивался во время хранения.

После спиртовых фиксаторов, таких, как фиксатор Карнуа, материал промывают трижды по 1—2 ч в 80%-м растворе спирта, до полного исчезновения запаха уксусной кислоты. Для этого заранее готовят три склянки со спиртом одной концентрации и на них наклеивают этикетки: *80%-й спирт 1*, *80%-й спирт 2* и *80%-й спирт 3*. Из пробирок через марлю сливают фиксатор и тотчас же, не допуская подсыхания материала, наливают в них 80%-й раствор *спирта 1*, который через 1—2 ч заменяют *раствором 2*, а еще позднее — *раствором 3*. Промытый материал оставляют на хранение в 80%-м растворе спирта. Фиксированный материал можно хранить и в 70%-м растворе спирта.

Чтобы ускорить обезвоживание, можно промывать объект в 96%-м растворе спирта. Это делают после таких фиксаторов, как ледяная уксусная кислота, уксусный алкоголь.

Для окончательного удаления остатков воды из фиксированного материала, находящегося в 80%-м растворе спирта, его помещают еще в четыре его раствора: два из них имеют концентрацию 96% и два — по 100%. В каждом из них объект выдерживают около 1 ч. Более длительное пребывание фиксированного материала в 100%-м спирте придает ему хрупкость, что нежелательно.

Следует заметить, что спирт не только обезвоживает, но и несколько уплотняет ткани. И то, и другое необходимо для последующей заливки материала в парафин.

Приготовление раствора спирта заданной концентрации. Спирты различной концентрации (20, 40, 60 и 80%-й), необходимые для частичного обезвоживания промытого материала, обычно готовят разведением 95—96%-го раствора этилового спирта. При этом пользуются *правилом Леви* или специальными таблицами.

Согласно правилу Леви для приготовления из двух растворов неодинаковой концентрации третьего с промежуточной концентрацией необходимо взять первый раствор в объеме, равном разности концентраций третьего и второго растворов, и добавить к нему второй раствор в объеме, равном разности концентраций первого и третьего растворов.

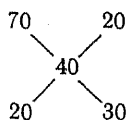
Например, нужно приготовить 20%-й раствор спирта из 95%-го и дистиллированной воды. Для расчета применяют следующую форму записи:

$$\begin{array}{ccc} 95 & & 0 \\ & \diagdown & \diagup \\ & 20 & \\ & \diagup & \diagdown \\ 20 & & 75 \end{array}$$

Цифра 75 в нижнем ряду справа равна разности концентраций первого и третьего растворов (95—20=75). Она указывает, сколько нужно взять миллилитров дистиллированной воды.

Цифра 20 в том же ряду слева равна разности концентраций третьего и второго растворов ($20 - 0 = 20$). Она указывает, сколько нужно взять миллилитров 95%-го раствора спирта. Итак, нужно взять 20 мл 95%-го раствора спирта и 75 мл дистиллированной воды для получения 95 мл 20%-го раствора спирта. Для получения 40, 60, 80%-х растворов аналогичным образом берут соответственно 40, 60, 80 мл 95%-го раствора и доводят дистиллированной водой до 95 мл. Так можно получить спирт любой концентрации, меньшей 95%.

Иногда необходимо получить спирт заданной концентрации из двух спиртов, один из которых имеет концентрацию выше требуемой, а другой ниже. Например, из 70%-го и 20%-го растворов нужно приготовить 40%-й. Поступают так же, как и в первом примере:



Из расчетов видно, что к 20 мл 70%-го раствора спирта надо добавить 30 мл 20%-го и получим 50 мл 40%-го раствора спирта.

При обезвоживании используют и 100%-й этиловый спирт, который иначе называют абсолютным. Приготовить его из 95—96%-го раствора можно несколькими способами: при помощи безводного сульфата меди, обезвоженного желатина в листках, дистилляцией спирта, в который добавлен оксид кальция.

В лабораторной практике наиболее распространен первый способ. Берут сульфат меди, полностью обезвоженный (аморфный порошок белого или бледно-голубого цвета) или содержащий несколько молекул кристаллизационной воды — медный купорос (крупные кристаллы темно-синего цвета).

Обезвоженный сульфат меди можно сразу использовать для окончательного удаления остатков воды из 95—96%-го раствора спирта. Медный купорос предварительно измельчают в ступке и осторожно прокаливают в фарфоровой чашке при температуре около 200°C , постоянно помешивая, чтобы не допустить побурения порошка. В результате соль теряет кристаллизационную воду и приобретает почти белый цвет. После остывания ее используют для обезвоживания спирта.

На 1 л спирта берут 200—250 г сульфата меди. Его насыпают на дно банки с притертой крышкой и заливают 95—96%-м раствором спирта. Обезвоженная соль активно поглощает остатки воды из спиртового раствора и приобретает голубой цвет. Частично обезвоженный спирт на другой день переливают в бутылку со свежим сульфатом меди. Обезвоживание повторяют несколько раз, до полного удаления воды. Последнее проверяют по цвету соли меди: если она при заливке спиртом сохраняет бе-

лый цвет, следовательно, в нем нет больше воды, т. е. спирт стал абсолютным. Более точно это определяют специальным прибором для измерения концентрации спирта.

Чтобы приготовить спирт без мути, порошок сульфата меди насыпают в бумажные гильзы из фильтровальной бумаги и по нескольку штук опускают на дно банки со спиртом.

Следует помнить, что абсолютный спирт, полученный с использованием сульфата меди, ядовит, так как содержит ионы меди. Кроме того, может измениться его кислотность.

Пропитывание промежуточной жидкостью и парафином

Для получения тонких микротомных срезов толщиной в несколько микрометров материал необходимо залить в парафин, который представляет собой смесь углеводов (реже используют целлоидин или желатин). Температура плавления его может быть различной. Для цитозембриологических исследований лучше брать парафин с температурой плавления 52—54°C. Он не смешивается со спиртом и водой, но хорошо растворяется в хлороформе, ксилоле, бензоле, толуоле. Промышленность выпускает гомогенизированный парафин в виде полупрозрачных белых плиток без примесей и пузырьков воздуха. Имея набор парафинов с различной температурой плавления, можно составить из них нужное вещество.

Гомогенизированный парафин перед употреблением расплавляют и выдерживают в таком состоянии в термостате один или несколько дней для того, чтобы улетучились нежелательные примеси. К тугоплавкому парафину прибавляют 5% пчелиного воска. Для хрупких объектов к парафину с температурой плавления 54—60°C, кроме воска, добавляют 5% стеарина. От механических примесей парафин освобождают фильтрованием в термостате на обычном фильтре. Так можно очищать все обрезки парафина, образовавшиеся во время работы.

Температуру плавления парафина легко определить следующим образом. Берут стеклянный капилляр, термометр и стакан с водой. Капилляр заполняют расплавленным парафином и после застывания парафина привязывают к термометру, помещают в стакан с водой, которую при этом медленно подогревают. Отмечают температуру в тот момент, когда парафин расплавится.

Успешно заключить объект в парафин удастся только в том случае, если было проведено тщательное обезвоживание фиксированного материала в 96%-м растворе и 100%-м этиловом спирте. Однако и в этом случае его не сразу помещают в парафин, поскольку спирт с парафином не смешивается. Обычно после абсолютного спирта материал переносят в так называемую

промежуточную жидкость — растворитель парафина, который позднее заменяют чистым парафином (табл. 1).

1. Растворители парафина и их основные свойства

Название растворителя	Растворение парафина при 50 °С, %	Температура кипения, °С	Растворимость в спирте
Ксилол	20,8	140	Очень хорошая
Бензол	21,5	80	То же
Толуол	25,0	111	Растворяется с трудом
Хлороформ	25,0	61	Очень хорошая

Важнейшие требования к растворителю: он должен хорошо смешиваться со спиртом и растворять парафин при температуре его плавления, легко испаряться при той же температуре.

Хороший растворитель парафина для мелких объектов (корни и бутоны) — хлороформ, а для крупных — бензол и ксилол. Это обусловлено тем, что последние два растворителя не так быстро испаряются, как хлороформ, поэтому пропитывание материала парафином идет успешнее. Хлороформ, используемый как растворитель парафина, не должен содержать воды. Для этого его наливают в темную бутылку, на дно которой насыпают безводный хлорид кальция слоем 3—4 см и выдерживают некоторое время.

Обезвоженный в спирте материал пропитывают растворителем парафина не сразу, а постепенно. Обычно готовят три смеси хлороформа с абсолютным спиртом с постепенно возрастающей концентрацией хлороформа:

1 ч. хлороформа + 3 ч. абсолютного спирта;

1 ч. хлороформа + 1 ч. абсолютного спирта;

3 ч. хлороформа + 1 ч. абсолютного спирта.

В каждой из этих смесей материал выдерживают около часа. Для более крупных объектов время увеличивают. В дальнейшем материал переносят в первую, а затем во вторую склянку с чистым хлороформом, каждый раз оставляя в нем на час или более. После этого чистый хлороформ в объекте замещают на парафин следующим образом. Корни или бутоны вместе с этикеткой переносят в небольшие стеклянные стаканчики диаметром 2,5 см и высотой 3 см с хлороформом, уровень которого на 3—4 мм выше материала. В эти стаканчики наливают расплавленный парафин и ставят их в термостат с постоянной температурой 56—57 °С, т. е. на 2—3 °С выше температуры плавления парафина. Здесь материал выдерживают несколько суток. За это время хлороформ испаряется, а объект пропитывается парафином. Окончательное испарение хлороформа устанавливают по отсутствию запаха у парафина в стаканчиках (проверяют каждый стаканчик).

Термостат, в котором находится материал, должен иметь надежный терморегулятор, чтобы поддерживать постоянную температуру, не допуская больших скачков, отверстия для притока воздуха и оттока паров хлороформа и достаточно толстые стенки. Он не должен искрить. Промышленность выпускает для заливки парафина термостат ТВЗ-25. Электрические контакты терморегулятора не должны находиться на пути оттока паров бензола или ксилола, в противном случае возможен взрыв. Термостат необходимо поместить в вытяжной шкаф, так как пары хлороформа вредны для здоровья. При отсутствии вытяжного шкафа вентиляционное отверстие термостата соединяют с водоструйным насосом, выводной конец которого не должен выходить за пределы лаборатории.

Когда материал пропитается парафином, в стаканчики добавляют еще немного чистого расплавленного парафина и спустя некоторое время выливают содержимое в подготовленные бумажные коробочки (рис. 27), металлические или фарфоровые формочки, в которых парафин быстро застывает. При этом соблюдают такую последовательность работы.

1. Заранее готовят бумажные коробочки из пергамента или другой плотной бумаги.
2. Вынимают пинцетом этикетки из стаканчика, а содержимое выливают в коробочку.
3. Корни или бутоны быстро и равномерно раскладывают по дну коробочки нагретым пинцетом.
4. На поверхность слегка застывшего парафина осторожно кладут этикетку надписью вверх.
5. Коробочки помещают на поверхность холодной воды в широкую чашку. Охлаждение парафина необходимо для того, чтобы он меньше крошился во время резки на микротоме.

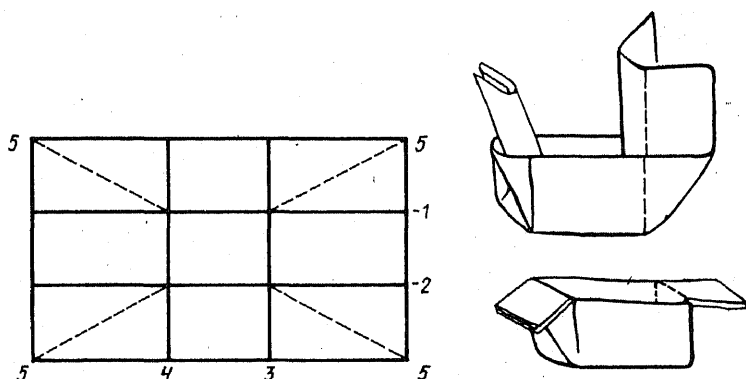


Рис. 27. Изготовление бумажных коробочек. Цифры указывают последовательность сгибания бумаги. По Д. Кисели.

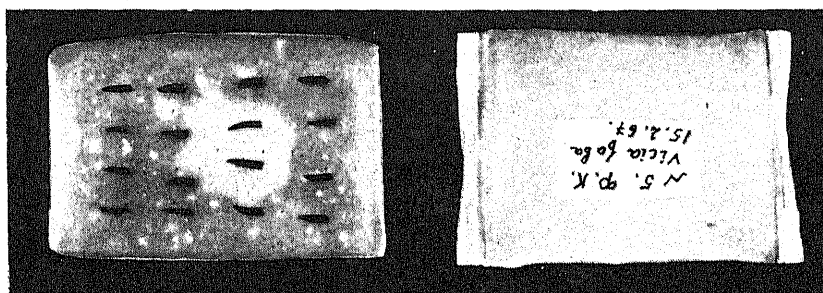


Рис. 28. Корешки, залитые в парафин:
слева — в бумажной коробочке, справа — без коробочки.

Парафин вместе с объектами после охлаждения принимает форму коробочки, в которую его залили («парафиновый пряник»). Если снять бумажную коробочку, то сквозь полупрозрачный парафин хорошо видны корни или бутоны (рис. 28). В таком состоянии материал может долго храниться и легко выплавляется при изготовлении блоков.

Приготовление парафиновых блоков

Для работы на микротоме из «парафиновых пряников» готовят парафиновые блоки, которые укрепляют на деревянных держателях. Держатели устанавливают в объектодержателе микротомы. Блок режут на определенную толщину.

В лабораторной практике деревянные держатели иначе называют кубиками. Их готовят из древесины дуба, бука, березы размером $1,5 \times 2 \times 2,5$ см и перед употреблением пропитывают расплавленным парафином. На боковую сторону держателя приклеивают этикетку.

Готовят блоки двумя способами. В первом случае из «пряника» бритвой вырезают кусочки парафина с объектом и расплавленным парафином прикрепляют их к деревянному держателю. В таких блоках материал должен быть ориентирован определенным образом и окружен со всех сторон слоем парафина толщиной 1—2 мм. Обычно так готовят блоки, содержащие крупные эмбриологические объекты. Лезвием острой бритвы придают блоку форму параллелепипеда, грани которого параллельны граням держателя.

Во втором случае используют метод закапывания по С. Г. Навашину. Он более кропотлив, чем первый, но дает надежные результаты при заливке корней и мелких бутонов. Необходимо заранее приготовить для работы спиртовку, глазной зонд или

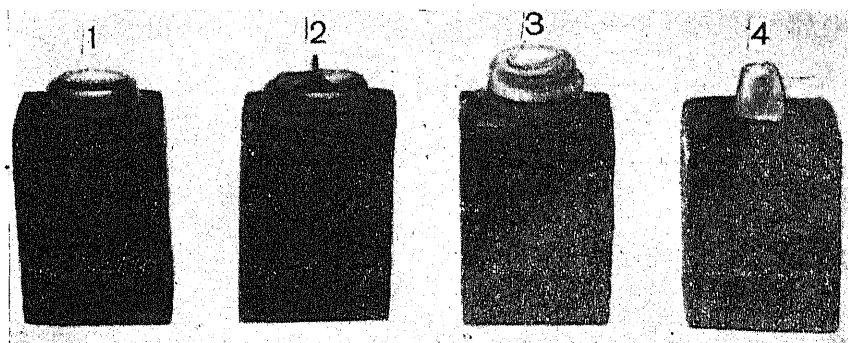


Рис. 29. Последовательные этапы заливки корешков методом закапывания блоков:

1 — парафиновая капля; 2 — корешок в капле; 3 — полностью залитый блок; 4 — блок после обрезки.

серебряную проволочку, парафиновые палочки, этикетки, лезвие безопасной бритвы, скальпель, деревянные держатели и «парафиновый пряник» с материалом.

Парафиновые палочки делают из парафина с такой же температурой плавления, какую имел парафин, использованный для пропитывания материала в термостате. В парафин добавляют 5% воска. Расплавленный и отфильтрованный парафин заливают в коробочки из пергамента длиной 15 см, шириной 10 мм и толщиной 5—8 мм. Коробочки быстро охлаждают в воде, снимают бумагу, а палочки хранят в пустых эксикаторах или картонных коробках.

При изготовлении парафиновых блоков методом закапывания придерживаются следующей последовательности в работе (рис. 29).

1. Рабочую поверхность деревянного держателя нагревают над спиртовкой и на теплую поверхность наносят каплю жидкого парафина. Капля должна быть в центре держателя и иметь максимальный диаметр. Высота ее обычно 3—4 мм. Чтобы аккуратно выполнить эту работу, следует научиться осторожно плавить над спиртовкой парафиновую палочку.

2. Выплавливают объекты с нижней стороны пряника. Для этого вокруг корней или бутонов расплавляют парафин нагретым зондом (см. рис. 26). Когда объект окажется в капле жидкого парафина, его переносят на стекло. Обычно выплавляют несколько корней или мелких бутонов. Если корни имеют неодинаковую длину, то их выравнивают лезвием бритвы. Иногда «пряник» целиком расплавляют в фарфоровой чашке над спиртовкой. Объекты вылавливают и сразу заливают в парафиновый блок. Такие блоки лучше режутся на микротоме.

3. Монтируют объекты в капле парафина на деревянном держателе. Корни устанавливают вертикально (чехликами вверх) для получения поперечных срезов, на которых обычно подсчитывают хромосомы. Для изготовления продольных срезов корни укладывают горизонтально (параллельно одной из длинных сторон держателя). В один блок обычно помещают несколько мелких объектов на одном уровне. Чтобы перенести корни со стекла, их осторожно сдвигают скальпелем, а потом, коснувшись (перпендикулярно!) подогретым зондом, переносят по одному в предварительно расплавленную центральную часть парафиновой капли.

4. Постепенно подплавляют нагретым зондом парафиновую каплю со всех сторон и окончательно заключают объекты в парафин, накапывая расплавленный парафин небольшими каплями со всех сторон, а затем сверху. Чтобы парафин не сбегал, каждую новую каплю наносят на поверхность пленки блока. При этом не следует быстро отнимать парафиновую палочку от капли.

Правильно залитый блок должен быть однородным. Это удастся, когда новые капли парафина наносят на незастывшую поверхность блока. Закапывание продолжают до тех пор, пока объекты не окажутся внутри прозрачной капли, из которой при остывании не должны выступать кончики корней.

Блок вместе с держателем опускают в холодную воду. После остывания лезвием безопасной бритвы ему придают форму правильного параллелепипеда или усеченной пирамиды. Обрезку парафинового блока начинают с верхней поверхности. Осторожно снимают лишний парафин, оставляя над объектом слой 2 мм. Затем обрезают блок с боковых сторон, добиваясь, чтобы грани его были параллельны граням деревянного держателя.

Таким образом, объекты заключены в парафиновый блок определенной формы, который можно резать на микротоме.

Получение микротомных срезов

Лабораторный прибор, предназначенный для получения тонких срезов у различных объектов, называют *микротомом*. Тонкие срезы с объектов, залитых в парафиновые блоки, готовят на микротоме двух типов: *салазочном*, или *санном*, и *ротационном* (рис. 30, А, Б).

Наиболее распространен салазочный микротом, у которого нож свободно перемещается на салазках, а деревянный держатель с парафиновым блоком прочно укреплен в объектодержателе, который может подниматься на определенную высоту при помощи микрометрического винта или перемещаться по наклонной плоскости вверх.

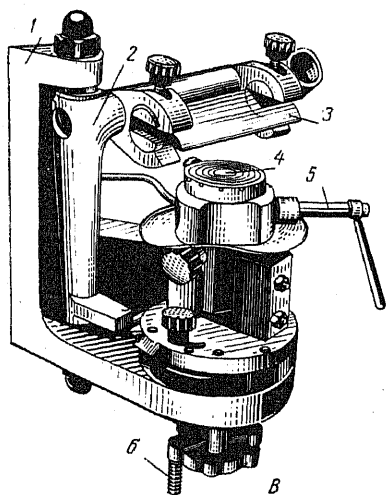
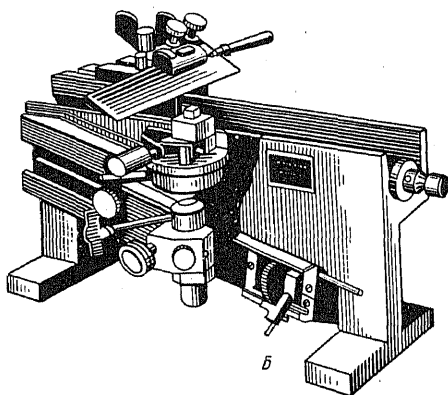
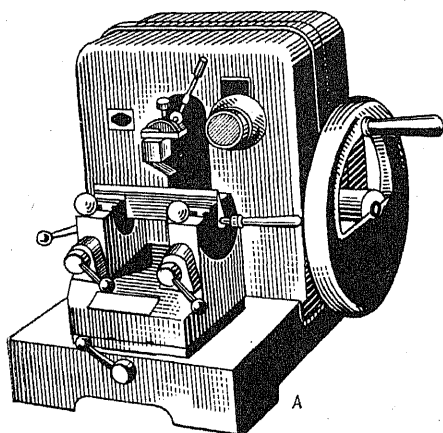


Рис. 30. Микротомы:

А — ротационный; Б — салазочный (А, Б — по Проziной, 1960); В — замораживающий; 1 — станция; 2 — ножедержатель; 3 — нож; 4 — замораживающий столик; 5 — игольчатый клапан; 6 — микрометрический винт.

В ротационном микротоме нож укреплен неподвижно острием вверх, а объект движется по вертикали при помощи специального подающего механизма, снабженного колесом или рукояткой.

Кроме рассмотренных двух, существует еще микротом *замораживающего* типа (рис. 30, В), на котором режут объекты в замороженном состоянии. На столик такого микротомы в каплю

воды помещают объект и подают к нему угольную кислоту под давлением. Столик охлаждается, объект становится неподвижным в капле, после чего его можно резать. В некоторых случаях охлаждают не только столик, но и нож. Метод замораживания применяют при диагностических, гистохимических, анатомических и других исследованиях. Здесь трудно получить тонкие срезы, а также непрерывную серию срезов, но зато он прост и требует немного времени.

Важнейшая составная часть микротомов — ножи (бритвы). Микротомные ножи делят на две группы: с плосковогнутой и плоской с двух сторон формой. Первые используют для резки объектов, залитых в парафин, а вторые — для резки заморожен-

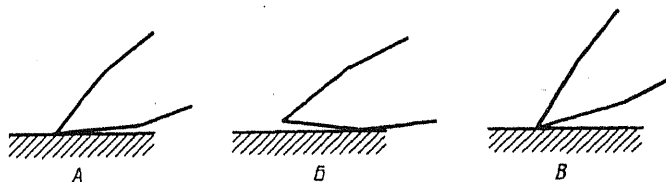


Рис. 31. Схематическое изображение правильного (А) и неправильного (Б, В) наклонов ножа. По Ромейсу.

ных и труднорежущихся объектов. Микротомный нож требует тщательного ухода и бережного отношения. Небольшой удар или прикосновение лезвием к плотному предмету портит его. После работы нож вытирают насухо и хранят в футляре. Его необходимо своевременно точить и править. От этих операций зависит качество срезов. При точке влажный нож ведут по камню (из песчаника или карборунда) против лезвия в том и другом направлениях, оборачивая его вокруг обушка на конечных пунктах движения. Перед резкой на микротоме нож правят на ремне для шлифовки фасеток и придания грани большей работоспособности. Нож ведут обушком вперед поперек ремня по всей его длине, используя в работе нижнюю сторону ремня. При правке нож смачивают водой.

Качество срезов на салазочном микротоме зависит от установки наклона ножа, определяемого углом, который образует нижняя поверхность ножа с плоскостью среза объекта. Этот угол должен составлять $2-5^{\circ}$. Допустимо положение, при котором сетка параллельна плоскости резания (рис. 31).

Последовательность работы на санном микротоме.

1. Микротом очищают от пыли и парафиновых стружек, а движущиеся части смазывают вазелиновым маслом. В камеру с микротомом, изготовленную из фанеры или плексигласа (размеры ее зависят от размеров микротомы), ставят лампу для подогревания ножа и блока в холодное время.

2. Подготовленный острый нож плосковогнутого типа устанавливают под определенным углом так, чтобы фасетка лезвия была параллельна граням парафинового блока и перпендикулярна направлению движения. Во время работы нож вытирают тряпочкой, смоченной в ксилоле.

3. Закрепляют деревянный держатель с парафиновым блоком в объектодержателе так, чтобы получить поперечные или продольные срезы. Нож и верхнюю поверхность парафинового блока осторожно сближают.

4. Устанавливают микрометрическим винтом необходимую толщину срезов в микрометрах. Она зависит от объекта и цели исследования. Так, для наблюдения митохондрий толщина сре-

зов — до 5 мкм, для подсчета числа хромосом в корнях — 10—15, а при эмбриологических исследованиях — 15—25 мкм.

5. Приступают к резке парафинового блока. Для этого при заднем положении ножа подают объектодержатель на толщину среза, например на 12 мкм. В результате парафиновый блок поднимается вверх к фасетке ножа на это же расстояние. Затем перемещают салазки с ножом к себе и срезают слой парафинового блока толщиной 12 мкм. Отодвинув назад салазки с ножом, снова подают объект при помощи микрометрического винта и передвигают салазки с ножом к себе. Так делают второй срез и т. д. В результате получается непрерывная лента срезов. Если нож во время работы стучит, следовательно, его наклон недостаточен.

6. Срезы в виде ленты снимают с ножа мягкой кисточкой и укладывают в определенной последовательности на черную поверхность дна длинной, но неглубокой коробки, в которую помещают этикетку. Верхняя и нижняя поверхности ленты неодинаковы по внешнему виду: первая матовая, вторая блестящая. Ленту укладывают в коробку, не переворачивая ее, т. е. блестящей стороной вниз. После этого приступают к наклеиванию срезов на предметные стекла. Микротом после работы необходимо очистить от стружек и поместить в футляр.

Неудачи при изготовлении срезов. Рассмотрим возможные затруднения и причины неудач при получении микротомных срезов.

1. Срезы мнутся и прилипают к ножу. Это может быть вызвано высокой температурой в камере с микротомом или тем, что взятый для заливки парафин оказался слишком мягким. Указанные причины можно устранить изменением температуры в камере и перезаливкой материала в более твердый парафин.

2. Срезы крошатся. Это происходит из-за низкой температуры в камере или оттого, что парафин слишком твердый и медленно охлаждается во время заливки блока. Обе причины также устранимы.

3. Срезы полосатые, раскалываются вдоль. Объясняются подобные дефекты тем, что нож имеет зазубрины. В таком случае его передвигают.

4. Срезы сдвигаются с ножа при его обратном ходе. Это значит, что нож грязный с нижней стороны и его необходимо вычистить.

5. Лента искривляется. Часто такое явление наблюдается потому, что передний и задний края блока не параллельны лезвию ножа. Для его устранения осторожно обрезают парафиновый блок, придав ему правильную форму.

6. Микротом делает «пропуски» или срезы получаются неодинаковой толщины. Следовательно, нож стоит слишком полого и необходимо изменить его наклон.

7. Срезы получаются волнистые (гофрированные). Чаще всего это объясняется плохой заливкой блока, и необходимо залить блок снова.

8. Объект выпадает из блока во время резки на микротоме. Это явление может быть вызвано плохим пропитыванием материала, что не всегда удается устранить. Другая причина его может заключаться в том, что материал пропитывался в термостате более мягким парафином, чем тот, которым закапывался блок. Необходимо также проверить, не затупился ли нож.

Наклейка парафиновых срезов на предметные стекла

Подготовка предметных и покровных стекол. Очень важный момент в работе — подбор предметных и покровных стекол для препаратов. От толщины стекол зависит правильная фокусировка препаратов. Световой микроскоп имеет объективы с определенным рабочим расстоянием (у иммерсионных объективов оно равно 0,1—0,12 мм). Ясно, что этими объективами можно воспользоваться в том случае, если толщина предметного и покровного стекол не выходит за допустимые величины, а именно 1—1,2 мм для предметных и 0,17 мм для покровных стекол. Кроме того, стекла должны иметь ровную поверхность, без мутных пятен и царапин. Поэтому предварительно следует отбраковать стекла.

Следующий момент, на который необходимо заранее обратить внимание, — чистота стекол. Наклеенные срезы хорошо держатся только на абсолютно чистой поверхности.

Обычно предметные стекла очищают так: кипятят в мыльной воде, промывают в водопроводной и при необходимости опускают в *хромовую смесь*, состоящую из трех частей насыщенного водного раствора бихромата калия и одной части концентрированной серной кислоты. При этом нужно помнить, что *кислоту вливают в дихромат калия*, а не наоборот.

Из хромовой смеси стекла вынимают пинцетом и промывают проточной и дистиллированной водой. У чистых стекол поверхность полностью смачивается водой. Отобранные стекла помещают в стакан с дистиллированной водой, где они хранятся до употребления. Очень удобны в работе предметные стекла с матированными концами, на которых можно делать надписи обычным карандашом.

Покровные стекла отбирают размером 20×20 или 24×24 мм, более крупные применяют только для эмбриологических исследований. Очищают стекла в смеси спирта и эфира, вытирают мягкой тряпочкой и хранят в сухом виде до использования.

Наклейка парафиновых срезов. Подготовив предметные стекла, можно приступить к наклеиванию парафиновых срезов. Для этого вынимают пинцетом одно стекло из сосуда с

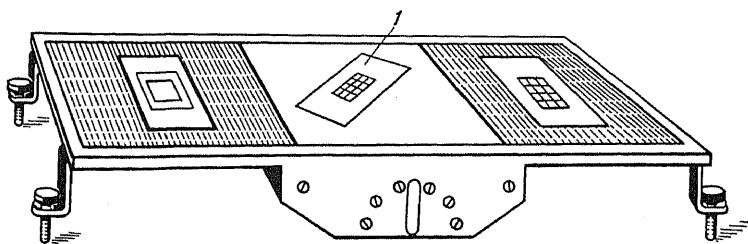


Рис. 32. Нагревательный столик для расправления микротомных срезов:

1 — предметное стекло с препаратом. По М. Н. Прозиной.

дистиллированной водой и, держа его пальцами за края, вытирают чистой тряпочкой нижнюю поверхность. Затем кладут стекло на ровную поверхность стола.

Наклеивать срезы можно разными способами. Наиболее распространенный способ с использованием обычной дистиллированной воды. Однако он дает хорошие результаты, только если предметные стекла будут абсолютно чистыми.

Порядок работы следующий. На поверхность предметного стекла из капельницы наносят несколько капель дистиллированной воды. Скальпелем разрезают парафиновую ленту на отрезки с равным количеством срезов. Каждый отрезок переносят скальпелем на поверхность воды, соблюдая последовательность расположения срезов. Необходимо также следить, чтобы нижняя (блестящая) сторона их непосредственно касалась воды. Общее число срезов, которые можно уложить на одно предметное стекло, рассчитывают, принимая во внимание величину покровного стекла. Отрезки парафиновой ленты лучше укладывать перпендикулярно длинной стороне предметного стекла.

Сморщенные парафиновые срезы надо расправить. Для этого предметные стекла со срезами, плавающими в воде, переносят на ровную поверхность нагревательного столика (приспособление для сушки и расправления парафиновых срезов на предметных стеклах, рис. 32), имеющего латунную пластинку с подогревом от электротока. Во время расправления срезов следят, чтобы со стекол не испарилась вода. Срезы можно расправить и под лампой, а также на подогретых асбоцементных пластинках. Теплые предметные стекла с расправленными срезами переносят на черную поверхность стеклянной пластинки (можно использовать фотопластинки).

Теперь очень важно расправленные срезы правильно и плотно уложить так, чтобы они были друг против друга в вертикальном и горизонтальном положениях. Вместе с тем срезы должны находиться в центре предметного стекла и не выходить за контуры покровного. Чтобы аккуратно уложить срезы, сна-

чала удаляют избыток дистиллированной воды фильтровальной бумагой и скальпелем поправляют их. Окончательно удаляют воду уже после того, как срезы уложены. Для этого на них сверху помещают полоску фильтровальной бумаги и осторожно проводят по ней пальцем. Последнее можно делать только тогда, когда срезы остыли, иначе они приклеятся к бумаге.

Предметное стекло со срезами подписывают обычным графитовым карандашом, если оно матировано, или тушью с белком, для чего жидкую черную тушь смешивают с равным объемом смеси куриного белка с глицерином. Используют также алмазный карандаш. Затем предметное стекло немедленно ставят сушить в термостат при температуре 40°C. Следует помнить, что если срезы высохнут при комнатной температуре, они потом отстанут от стекла. Сушку в термостате ведут двое-трое суток.

Срезы пристают к стеклу вследствие капиллярного притяжения. Если они приклеены хорошо, при просматривании их с нижней стороны предметного стекла не должно быть отсвечивающих мест. Последнее указывает на то, что между стеклом и срезами остался воздух. Такие срезы легко отклеятся, как только окажутся в жидкости.

Существуют и другие способы наклеивания срезов на предметные стекла, например с использованием белка с глицерином. Для этого к свежему куриному белку добавляют равный объем глицерина. После взбалтывания смесь фильтруют. Фильтрация протекает медленно. В фильтрат добавляют кристаллик антисептика (тимола, фенола).

Есть два варианта наклеивания срезов белком: сухой и водный. В первом случае на предметное стекло наносят каплю белка с глицерином и кончиком пальца или льняной тряпочкой растирают его тонким слоем. Переносят срезы на стекло кисточкой. Сначала к стеклу прижимают один угол среза, а потом и весь срез. Предметные стекла со срезами подогревают, после чего их можно сразу подвергнуть дальнейшей обработке.

Белково-глицериновую смесь можно разводить водой: 1 каплю смеси взбалтывают с 4 мл дистиллированной воды. Воду с белком и глицерином наносят пипеткой на предметное стекло, в нее помещают срезы. Срезы расправляют на нагревательном столике, удаляют избыток жидкости и сушат.

Удаление парафина и окрашивание срезов

Парафиновые срезы, наклеенные на предметные стекла, непосредственно изучать под микроскопом трудно. Для выявления отдельных компонентов клетки необходимо освободить их от парафина, а затем окрасить. Последовательность работы следующая.

1. Освобождение срезов от парафина ксилолом.

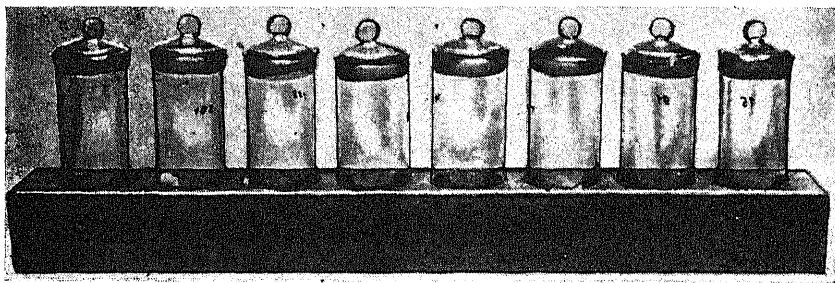


Рис. 33. Набор стеклянных цилиндров в деревянном штативе для окрашивания препаратов.

2. Удаление ксилола путем замещения его на 96%-й раствор спирта.
3. Удаление спирта промывкой срезов в воде.
4. Протравливание с последующей промывкой (применяется не всегда).
5. Окрашивание и промывание.
6. Дифференцирование и промывание (применяется не всегда).
7. Обезвоживание срезов в 96%-м растворе и 100%-м спирте.
8. Замещение спирта на ксилол.
9. Заключение в канадский бальзам.

Приведенная схема берется за основу при различных методах окрашивания постоянных препаратов, отличающихся в деталях в зависимости от того, применяют один или несколько красителей, какой используют способ окрашивания, как проводят обезвоживание и т. д.

Перед началом работы выбирают метод окрашивания, составляют схему работы, подбирают посуду и готовят растворы. Очень удобны цилиндрические сосуды высотой 11—12 см и диаметром 5 см с притертыми крышками (рис. 33). Эти сосуды с наклеенными этикетками в определенной последовательности помещают в деревянные бруски с гнездами. Одновременно готовят стаканы для промывания препаратов в воде, капельницы с ксилолом, абсолютным этиловым спиртом и 96%-м его раствором, чистые покровные стекла, пинцеты, канадский бальзам, марлю и фильтровальную бумагу. Для дифференцировки необходимы набор кювет с растворителем и микроскоп. Канадский бальзам готовят, растворяя кристаллы бальзама в ксилоле до консистенции, напоминающей жидкий пчелиный мед.

Переносят препараты из одного сосуда в другой пинцетом, избегая загрязнения реактивов, что может отразиться на качестве препаратов. Например, ксилол можно занести в спирт, и тогда при последующем переносе препаратов в воду они станут

мутными. При переносе препаратов из одной жидкости в другую принято обмывать их из капельницы с обеих сторон. Например, после ксилола препарат обмывают 96%-м раствором спирта, а затем переносят в сосуд с таким же раствором. Обмывают препарат и перед переносом его в абсолютный спирт, чтобы не занести в него воду. Ни в коем случае нельзя допускать подсыхания срезов во время переноса препаратов из одной жидкости в другую.

Для каждого объекта выбирают свой метод окрашивания в зависимости от цели исследования и фиксатора. Различные структуры в клетке неодинаково воспринимают и удерживают красители. Все известные красители по своему происхождению делят на три группы: *растительного* происхождения, *животного* и *синтетические*. Последние, в свою очередь, делят на *основные*, *кислые* и *нейтральные*. Для окраски ядер используют основные синтетические красители (генциановый фиолетовый), а также растительного (гематоксилин) и животного (кармин) происхождения. Растворы красителей могут быть спиртовыми и водными. В последние добавляют кристаллик антисептика — тимола.

Существующие методы окрашивания можно разделить на две группы. При первой — с *прогрессивным окрашиванием* — срезы помещают в слабый раствор красителя. Окрашивание длится несколько минут, пока необходимые структуры в клетке не будут четко видны на препарате. При второй — с *регрессивным окрашиванием* — срезы заведомо перекрашивают концентрированным раствором красителя. Избыток краски удаляют со срезов в специально подобранных растворах. Этот прием называют *дифференцированием препаратов*, в ходе которого краску следует оставить только на определенных структурах клетки. Контроль за дифференцированием ведут под микроскопом, используя объективы с небольшим увеличением.

Окрашивание срезов гематоксилином по Гейденгайну. Гематоксилин готовят из экстракта кампешевого дерева. Для окрашивания срезов используется продукт окисления гематоксилина — гематеин ($C_{16}H_{12}O_6$). Существует два способа приготовления красителя.

Первый способ (ускоренный, часто используется в лабораториях). 1 г гематоксилина растворяют в 100 мл дистиллированной воды в колбе при кипячении на водяной бане в течение 30—60 мин. После остывания раствор фильтруют четыре раза для окисления гематоксилина и добавляют кристаллик тимола. Необходимо сразу обратить внимание на цвет готового красителя. Он должен быть ярко-красным или красно-бурым. Желтоватый оттенок указывает на его невысокое качество, в результате чего трудно получить хорошую окраску срезов.

Приготовленный краситель разводят перед употреблением равным объемом дистиллированной воды.

Второй способ. 1 г гематоксилина растворяют в 10 мл 96%-го раствора этилового спирта, добавляют 90 мл дистиллированной воды, выдерживают на свету 3—4 недели, затем фильтруют и разводят перед употреблением.

Гематоксилин по Гейденгайну применяют для окрашивания цитологических и эмбриологических препаратов. При окраске хромосом хорошие результаты получают при использовании фиксатора Навашина. Этот же краситель применяют для окраски митохондрий.

Во время окрашивания срезов надо стремиться не загрязнить краситель. Окрасив небольшую партию препаратов, его нужно отфильтровать и вновь использовать. Перед употреблением хранившегося красителя сначала определяют его пригодность для работы. Для этого в стакан с водопроводной водой вливают несколько капель гематоксилина. Испорченный краситель дает желтую или грязно-лиловую окраску, нормальный — аметисто-лиловую.

Необходимо заранее приготовить деревянные бруски с гнездами и цилиндрические сосуды с притертыми крышками. На сосуды наклеивают этикетки с указанием реактивов. Кроме того, готовят стаканы для воды, капельницы с абсолютным спиртом и 96%-м его раствором и ксилолом, чистые покровные стекла, пинцеты с широкими концами, нарезанную фильтровальную бумагу и марлевые салфетки, кюветы для дифференцирования, микроскоп, реактивы: метаксил, абсолютный этиловый спирт и 96%-й его раствор, 0,5—1%-й раствор гематоксилина, 2%-й и 4%-й растворы железоммонийных квасцов, канадский бальзам.

Во время работы следует соблюдать такую последовательность.

1. Помещают предметные стекла с наклеенными срезами в *первый* сосуд с ксилолом для удаления парафина. Длительность пребывания срезов в нем 10—30 мин, однако можно задержать препараты здесь и на более длительное время. Стекла ставят в сосуд с ксилолом парами, срезами наружу. Каждую пару стекол перекалывают фильтровальной бумагой или спичками.

2. Переносят стекла со срезами во *второй* сосуд со свежим ксилолом на 5 мин.

3. Обмывают каждое стекло 96%-м раствором спирта из капельницы и помещают в сосуд с этим же раствором. Длительность пребывания срезов в спирте 5 мин, иногда это время следует увеличить до 15—30 мин.

4. Промывают стекла со срезами в трех сменах дистиллированной воды по 5—10 мин. Стекла не должны иметь жирных следов и быть мутными.

5. Помещают стекла со срезами в 4%-й раствор железоммонийных квасцов для протравливания на 4—6 ч.

6. Тщательно промывают стекла в дистиллированной воде в течение 5—10 мин.

7. Помещают стекла со срезами в 0,1—1%-й раствор гематоксилина на 10—12 ч.

8. Промывают стекла со срезами сначала в водопроводной, а потом в дистиллированной воде по 10—15 мин.

9. Дифференцируют срезы в 2%-м растворе железозамонийных квасцов, в котором они быстро теряют краситель и из черных становятся синими. Окончательную дифференцировку ведут под микроскопом после промывки в дистиллированной воде, чтобы установить момент почти полной потери красителя цитоплазмой. Ядра должны оставаться интенсивно окрашенными.

10. Промывают отдифференцированные срезы в проточной воде в течение 15 мин.

11. Обмывают стекла со срезами 96%-м раствором спирта из капельницы и помещают в сосуд с этим же раствором на 5—15 мин.

12. Обмывают стекла со срезами абсолютным спиртом из капельницы и помещают в сосуд с этим же спиртом на 10—15 мин.

13. Помещают стекла со срезами в смесь 100%-го спирта и ксилола на 3—5 мин.

14. Обмывают стекла со срезами ксилолом из капельницы и помещают в *третий* сосуд с ксилолом на 15 мин, затем в *четвертый* — на 5 мин.

15. Закрывают срезы в канадский бальзам.

Для рассматриваемого способа окрашивания характерно протравливание срезов железозамонийными квасцами. При последующем действии красителя образуется черный железогематинный лак, который неодинаково удерживается различными структурами клетки. Окраска сохраняется многие годы. Цитоплазму, ядрышки и оболочку можно подкрашивать сразу после дифференцировки 1%-м раствором эозина.

Срезы, заключенные в бальзам, во время просмотра их под микроскопом выглядят иначе, чем в воде. Хромосомы имеют темно-синий цвет, цитоплазма и оболочки — бесцветные, если не было подкраски.

Существует ускоренный способ окрашивания срезов железным гематоксилином. В этом случае протравливание в квасцах и окрашивание в гематоксилине ведут в течение 30—40 мин в термостате при температуре 45—56°C.

Окрашивание срезов гематоксилином по Делавилье. Этот способ чаще используют в работе с эмбриологическими препаратами. Хорошие результаты получаются только при правильном приготовлении красителя. К 100 мл насыщенного водного раствора алюмоамонийных квасцов прибавляют по каплям раствор, состоящий из 1 г гематоксилина,

растворенного в 6 мл абсолютного спирта. Полученный раствор ставят на неделю на свет в колбе с неплотной пробкой для доступа воздуха. Затем в колбу добавляют по 25 мл глицерина и метилового спирта и не ранее чем через 4 ч раствор фильтруют.

Краситель готов к употреблению спустя 1—2 мес. Его можно долго хранить в темном месте. Перед употреблением краситель разводят в 3—4 раза дистиллированной водой.

Последовательность работы следующая.

1. Помещают предметные стекла со срезами в *первый* сосуд с ксилолом на 10—30 мин, а затем во *второй* — на 5 мин.

2. Обмывают стекла со срезами 96%-м раствором спирта из капельницы и помещают в сосуд с таким же спиртом на 5—30 мин.

3. Промывают стекла со срезами в двух сменах дистиллированной воды в течение 3—5 мин.

4. Помещают стекла со срезами в гематоксилин Делафильда на 5—10 мин.

5. Промывают стекла со срезами в водопроводной, а потом в дистиллированной воде 5 мин. Если срезы перекрашены, их можно дифференцировать в спирте, подкисленном соляной кислотой.

6. Переносят стекла со срезами в 1%-й раствор эозина на 1—2 мин (1 г эозина растворяют в 100 мл 70%-го раствора спирта или в дистиллированной воде). Дифференцировку срезов проводят в 96%-м растворе спирта.

7. Обмывают стекла со срезами 96%-м раствором спирта и переносят в сосуд с таким же раствором. Продолжительность пребывания в спирте контролируют при помощи микроскопа, так как в спирте идет дифференцировка срезов. Эозин должен подкрасить цитоплазму и ядрышки.

8. Обмывают 100%-м спиртом стекла со срезами и переносят сосуд с таким же спиртом на 1—3 мин.

9. Переносят стекла со срезами в смесь 100%-го спирта и ксилола на 1—3 мин.

10. Обмывают стекла со срезами ксилолом и переносят в *третий* сосуд с ксилолом на 5—10 мин, а затем в *четвертый* — на 5 мин.

11. Закljučают срезы в канадский бальзам.

Срезы, окрашенные по Делафильду, имеют ядра и хромосомы синего цвета. Эозин подкрашивает цитоплазму и ядрышки в малиновый цвет. Окраска сохраняется многие годы.

Окрашивание срезов генциановым фиолетовым по Ньютону. Метод применяют для окрашивания цитологических и эмбриологических препаратов. Он занимает мало времени. Хромосомы окрашиваются в фиолетовый цвет, оставаясь полупрозрачными, что облегчает подсчет длинных, нале-

гающих друг на друга хромосом. Окраска менее долговечна, чем при использовании предыдущих красителей.

Генциановый фиолетовый состоит из кристаллического фиолетового и примесей. Желательно брать чистый краситель, так как примеси окрашивают цитоплазму, что отрицательно сказывается на контрастности структур клетки. Для приготовления красителя растворяют 1 г генцианового фиолетового в 100 мл дистиллированной воды.

Последовательность работы следующая.

1. Помещают стекла со срезами в *первый* сосуд с ксилолом на 10—30 мин, затем во *второй* — на 5 мин.

2. Обмывают стекла со срезами 96%-м раствором спирта из капельницы и переносят их в сосуд с таким же раствором на 10—15 мин.

3. Промывают стекла со срезами в дистиллированной воде 3—5 мин.

4. Помещают стекла со срезами в 1%-й раствор генцианового фиолетового на 5 мин или дольше в зависимости от объекта.

5. Промывают стекла со срезами в дистиллированной воде в течение нескольких секунд.

6. Помещают стекла со срезами на 30 с в раствор: 1 г йода + 1 г йодида калия в 100 мл 80%-го раствора спирта (вместо спирта можно брать воду).

7. Обмывают стекла со срезами 96%-м раствором спирта и помещают в сосуд с таким же раствором на 2—3 с.

8. Обмывают стекла со срезами 100%-м спиртом и помещают в сосуд с ним на несколько секунд, но можно задержать дольше, чтобы улучшить обезвоживание.

9. Дифференцировку проводят в гвоздичном масле, а при его отсутствии — в карбол-ксилоле. Для приготовления последнего 70—80 мл ксилола смешивают с 20—25 мл расплавленного фенола. Колбу с фенолом подогревают на водяной бане. Можно дифференцировать в смеси гвоздичного масла и ксилола (1:1).

10. Помещают стекла со срезами в *третий* сосуд с ксилолом на несколько секунд, а затем в *четвертый* — на несколько минут.

11. Закрывают срезы в канадский бальзам.

Окрашивание срезов ацетокармином по Фаворскому. В цитологической практике ацетокармин обычно применяют для окрашивания временных препаратов. Однако его можно использовать и для приготовления постоянных препаратов. Н. В. Фаворский предложил два способа окрашивания.

Первый способ. На предметные стекла со срезами, освобожденными от парафина в ксилоле и доведенными до дистиллированной воды, накапывают ацетокармин (приготовление ацетокармина, см. с. 98). Срезы окрашивают несколько минут или стекла с ними подогревают на спиртовке до появления паров. Избыток ацетокармина сливают, стекла со срезами ополаски-

вают водой и дифференцируют в 0,5%-м растворе аммиака под микроскопом (выпускаемый промышленностью аммиак принимают за 100%-й). Затем их промывают в воде в течение 5 мин, обезвоживают в 96%-м растворе и 100%-м спирте, замещают спирт на ксилол и заключают срезы в канадский бальзам. Такие препараты по цвету сходны с препаратами, окрашенными по Фельгену.

Второй способ. Срезы окрашивают в ацетокармине в течение 5 минут, промывают в воде, а затем переносят в 3—5%-й раствор железоаммонийных квасцов и нагревают до появления паров. Стекла со срезами хорошо промывают в воде, обезвоживают в спиртах, переносят в ксилол, а затем заключают срезы в канадский бальзам. Хромосомы приобретают черный цвет.

Окрашивание срезов по Модилевскому. Эмбриологические препараты можно хорошо окрасить, применяя следующую схему работы.

1. Депарафинированные, т. е. освобожденные от парафина в ксилоле и промытые в спирте, срезы доводят до воды (см. с. 86).

2. Окрашивают срезы 0,25%-м водным раствором фуксина основного в течение 3 мин. Иногда время окрашивания может длиться несколько часов.

3. Промытые в воде срезы дифференцируют в 96%-м растворе спирта, пока не станут резко видны включения в цитоплазме, хроматиновые элементы и ядрышки в ядре.

4. Обезвоживают срезы в абсолютном спирте.

5. На предметное стекло со срезами наносят анилин с растворенным в нем красителем, например лихтерюном, метиленовой синей, азуром 1 или азуром 2. Анилин ($C_6H_5NH_2$) представляет собой бесцветную жидкость, малорастворимую в воде. Вместо него можно взять гвоздичное масло. Продолжительность окрашивания от 2 до 10 мин.

6. Дифференцируют срезы в смеси толуола или ксилола со спиртом (4:1).

7. Срезы помещают в толуол или ксилол, а затем заключают в бальзам.

Методика окрашивания хромосом у отдаленных гибридов по Элленгорну. Я. Е. Элленгорн (1947) изучал на микротомных препаратах мейоз у ржано-пырейного гибрида первого поколения *Secale cereale* × *Agropyron glaucum*. Оказалось, что при определенных условиях окрашивания препаратов можно наблюдать различие в окраске хромосом родительских пар. Колосья А. Я. Элленгорн фиксировал по Карнуа. Депарафинированные препараты протравливал железоаммонийными квасцами и окрашивал гематоксилином Гейденгайна, смешанным с равным объемом буферного раствора с pH 5. После дифференцировки препаратов хромосомы ржи (*Secale ce-*

reale), которые вели себя как униваленты, оказались окрашенными в черный цвет, а хромосомы пырея сизого (*Agropyron glaucum*) — в серый.

Окрашивание срезов для выявления нуклеиновых кислот, белков и углеводов. Для выявления дезоксирибонуклеиновой кислоты в ядрах клеток применяют реакцию Фельгена. Известно, что в состав ДНК входят остатки фосфорной кислоты, сахар (α -дезоксирибоза) и азотистые основания. Дезоксирибоза в ходе гидролиза с соляной кислотой превращается в альдегид, который при взаимодействии с фуксиносернистой кислотой (реактив Шиффа) окрашивается в красновато-фиолетовый цвет. Таким образом, реакция Фельгена состоит из двух этапов: гидролиза и окрашивания. В качестве контроля используются препараты, не подвергавшиеся гидролизу. Их помещают в фуксиносернистую кислоту на 10—15 мин. Окрашивания не должно быть.

Для успешного проведения этой работы необходимо приготовить следующие растворы:

фуксиносернистая кислота (реактив Шиффа). Растворяют 1 г основного фуксина для фуксиносернистой кислоты (обратить внимание на сложное название фуксина!) в 200 мл кипящей воды, остужают до 50 °C и прибавляют 20 мл 1 н. соляной кислоты; остужают до 25 °C и прибавляют 1 г сухого метадисульфита натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). Раствор помещают в цилиндрический сосуд, оклеенный снаружи черной бумагой (кроме дна). Через сутки жидкость обесцвечивается. Чтобы определить это, сосуд ставят на белую бумагу, открывают крышку и смотрят внутрь. Иногда жидкость имеет слабо-желтый цвет;

сернистая вода. К 200 мл проточной воды прибавляют 10 мл 10%-го раствора метадисульфита натрия и 10 мл 1 н. соляной кислоты. Используют в работе только свежий раствор;

соляная кислота, 1 н. раствор. Берут одну ампулу 0,1 н. фиксанала соляной кислоты и доводят ее содержимое дистиллированной водой до 100 мл. Получается 100 мл 1 н. соляной кислоты. Можно приготовить 1 н. раствор соляной кислоты и так: 82,5 мл HCl (плотность 1,19) доводят до 1 л водой.

Наклеивать срезы на предметные стекла при этом методе иногда приходится белком. Последовательность работы следующая.

1. Помещают предметные стекла со срезами в *первый* сосуд с ксилолом на 10—30 мин для удаления парафина и затем во *второй* — на несколько минут.

2. Обмывают стекла со срезами 96%-м раствором спирта и помещают в сосуд с таким же раствором на 10—15 мин.

3. Промывают стекла со срезами в дистиллированной воде в течение 3—5 мин.

4. Ополаскивают стекла со срезами 1 н. HCl и помещают в

сосуд с 1 н. HCl с температурой 60 °С для гидролиза. Сосуд должен находиться на водяной бане при постоянном контроле за температурой соляной кислоты. Время гидролиза при использовании фиксатора Карнуа или 10%-го раствора формалина 8 мин. Однако обычно его устанавливают в ходе работы по максимальной интенсивности цветной реакции.

5. Предметные стекла со срезами быстро остужают в холодной 1 н. HCl.

6. Помещают стекла со срезами в реактив Шиффа на 1—2 ч.

7. Переносят стекла со срезами последовательно в три сосуда с растворами сернистой воды (1, 2, 3) и держат в каждом из них по 2—5 мин.

8. Промывают стекла со срезами в проточной воде 15 мин, а затем в дистиллированной воде.

9. Подкрашивают срезы 1—2%-м водным или спиртовым раствором лихтгрюна.

10. Обмывают стекла со срезами 96%-м раствором спирта и помещают в такой же раствор на 1—2 мин.

11. Обмывают стекла со срезами 100%-м спиртом и помещают в сосуд с ним на несколько минут.

12. Помещают стекла со срезами в *третий* сосуд с ксилолом на 5—10 мин, а затем в *четвертый* — на несколько минут.

13. Закljučают срезы в канадский бальзам.

На интенсивность реакции Фельгена влияют продолжительность гидролиза и присутствие в клетке ряда веществ. Эта реакция идет медленнее при наличии солей железа, дубильных веществ и некоторых белков. Ее можно использовать для цитофотометрии ДНК в ядре клетки.

Содержание и локализацию нуклеиновых кислот в клетке можно определить, используя основные красители в сочетании с обработкой срезов ферментами-нуклеазами, способными разрывать связи между нуклеотидами ДНК или РНК.

Хорошими красителями для нуклеиновых кислот являются галлоцианин (или оксазин) и толуидиновый синий. Галлоцианин с хромовыми квасцами дает соединение крапlak-катион, которое с фосфатными группами нуклеиновых кислот образует соли темно-синего цвета. Чтобы исключить влияние белков, окрашивание нуклеиновых кислот нужно вести при pH 1,5—1,6.

Для приготовления красителя берут 5 г хромовых квасцов, растворяют их в 100 мл воды и добавляют 0,15 г галлоцианина. Смесь встряхивают, а затем нагревают до кипения. Длительность кипения 5 мин. После этого раствор охлаждают, фильтруют и доводят водой через фильтр до 100 мл. Краситель имеет pH 1,64. Последовательность работы следующая.

1. Депарафинированные срезы доводят до воды (см. с. 86).

2. Окрашивают срезы раствором красителя в течение двух суток при комнатной температуре.

3. Промывают срезы в воде и обезвоживают.

4. Просветляют срезы в ксилоле и заключают в бальзам.

Чтобы выявить содержание и локализацию одной из двух кислот (ДНК или РНК), препараты перед окрашиванием обрабатывают нуклеазами. Если после обработки рибонуклеазой окраска препарата ослабляется, то это происходит вследствие удаления РНК.

ДНК и РНК можно выявить красителями метиловым зеленым и пиронином с использованием рибонуклеазы по Браше.

Для этого готовят два раствора.

Раствор 1 состоит из 17,5 мл 5%-го водного раствора пиронина, 10 мл 2%-го метилового зеленого и 250 мл воды. Раствор хранят в холодильнике.

Чтобы очистить метиловый зеленый от примеси метилового фиолетового, к раствору красителя добавляют равный объем хлороформа, встряхивают смесь и оставляют на 1—2 дня для отстоя. Делительной воронкой отделяют верхний слой с метиловым зеленым от нижнего слоя. Эту процедуру повторяют несколько раз.

Раствор 2 представляет собой ацетатный буфер с рН 4,8. Для приготовления буфера в мерную колбу наливают 1,2 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объем до 100 мл. Затем отдельно растворяют в 100 мл воды 2,72 г ацетата натрия. Смешивают 74 мл раствора уксусной кислоты со 100 мл раствора ацетата натрия. Получается буфер с рН 4,8.

Перед употреблением растворы 1 и 2 смешивают в равных объемах. Последовательность работы следующая.

1. Депарафинированные срезы доводят до воды.

2. Помещают срезы в буферный раствор красителей на 20 мин, а затем омывают водой.

3. Обезвоживают срезы в ацетоне и последовательно переносят их в две смеси ацетона с ксилолом (10% ацетона и 90% ксилола, 50% ацетона и 50% ксилола).

4. Помещают срезы в ксилол, затем заключают в бальзам.

На препаратах метиловый зеленый окрашивает ДНК в зеленый цвет, а пиронин окрашивает РНК в красный. При этом параллельные препараты перед окрашиванием обрабатывают нуклеазами, например 0,1%-м водным раствором рибонуклеазы в течение 2—3 ч при температуре 37°C. Вместо рибонуклеазы можно использовать 5—10%-й раствор трихлоруксусной кислоты. Необходимость обработки параллельных препаратов нуклеазами связана с тем, что эти красители не специфичны для нуклеиновых кислот и могут связываться другими веществами. Так, пектиновые вещества могут также окрашиваться пиронином.

Для изучения локализации нуклеиновых кислот применяют люминесцентный метод с использованием красителя акридина

оранжевого. Этот краситель при низких концентрациях и определенном рН связывается с ДНК с образованием мономеров, окрашенных в зеленый цвет, а с РНК — с образованием красных димерных катионов, что обуславливает различное свечение этих кислот в ультрафиолетовом свете.

Для изучения растительных объектов после их фиксации по Карнуа иногда применяют методику Берталанфи. При этом депарафинированные срезы быстро проводят через растворы спирта (80, 70, 50%-й), дистиллированную воду, 1%-й раствор уксусной кислоты и снова через дистиллированную воду, а затем окрашивают в 0,01%-м растворе акридина оранжевого в течение 3 мин. Раствор акридина оранжевого вначале готовят в концентрации 0,1%, а перед употреблением разводят до 0,01% фосфатным буфером с рН 6. После окраски объект переносят на одну минуту в фосфатный буфер с рН 6 и дифференцируют в 0,1 М CaCl_2 1—2 мин, ополаскивают фосфатным буфером, накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом Люмам в сине-фиолетовом свете. Ядра клеток светятся ярко-зеленым, а ядрышки — желтовато-красным светом.

Для выявления основных белков (гистонов) используют специфический краситель прочный зеленый (фастгрюн).

Объекты после фиксации в 10%-м растворе формалина в течение 3—6 ч промывают в проточной воде 10—12 ч, обезвоживают и по обычной методике парафинируют. Краситель готовят, растворяя 100 мг прочного зеленого в 10 мл воды, и доводят рН до 8. Перед окрашиванием срезы помещают в 5%-й раствор трихлоруксусной кислоты на 15 мин при 100°C для удаления нуклеиновых кислот, которые могут маскировать окраску на белки. Последовательность работы следующая:

1. Депарафинированные срезы доводят до воды (см. с. 86).
2. Обработывают срезы трихлоруксусной кислотой.
3. Промывают срезы в 70%-м растворе этилового спирта, а затем в воде.
4. Переносят срезы в краситель на 20 мин при 22°C.
5. Последовательно переносят срезы в воду, в 96%-й раствор спирта, карбол-ксилол, ксилол и заключают в бальзам.

На препаратах основные белки окрашиваются в изумрудно-зеленый цвет.

Для одновременного выявления белков и углеводов применяют свежеприготовленные проционовые красители. Работу выполняют в следующей последовательности.

1. Депарафинированные срезы доводят до воды (см. с. 86).
2. Окрашивают срезы 0,1%-м раствором проционового ярко-голубого RS в фосфатном буфере при рН 5,6—6 и температуре 55—60°C в течение часа.
3. Тщательно промывают срезы в дистиллированной воде.
4. Окрашивают срезы 0,1%-м раствором проционового ярко-

красного 2BS в 1%-м растворе соды (рН 10,5) в течение 20 мин при комнатной температуре.

5. Срезы промывают водой, обезвоживают, переносят в ксилол и заключают в бальзам.

Монтирование препаратов

Предметные стекла со срезами вынимают из ксилола пинцетом, вытирают с нижней стороны и кладут на ровную поверхность, покрытую белой бумагой. Затем быстро, не допуская подсыхания срезов, капают сверху одну каплю канадского бальзама и каплю чистого ксилола. Берут чистое покровное стекло, ставят его наклонно на предметное, касаясь бальзама, и осторожно опускают. Справа и слева от покровного стекла кладут кусочки фильтровальной бумаги для удаления излишков ксилола и бальзама. Затем препарат осторожно вытирают тряпочкой, смоченной в ксилоле, и сушат в течение нескольких дней. Иногда на препараты сверху накладывают небольшие гиришки массой 5—10 г для удаления пузырьков из-под покровного стекла.

После сушки препарат окончательно протирают, просматривают под микроскопом и подписывают. На левой стороне его ставят очередной номер, который заносят в специальный каталог с указанием способа окраски и номера по журналу фиксации.

На правой стороне препарата наклеивают этикетку с указанием названия препарата, например: «Двойное оплодотворение мягкой пшеницы». Дробью указывают отмеченный срез на препарате. Например, $\frac{2}{2}$, т. е. второй срез во втором ряду. Иногда срезы отмечают тушью с нижней стороны препарата. Готовые препараты хранят в специальных коробках.

ПОСТОЯННЫЕ ГЛИЦЕРИНОЖЕЛАТИНОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Для анатомических исследований в тех случаях, когда возникает необходимость быстро приготовить постоянный препарат, например с пылевыми зернами или прорастающими пылевыми трубками в пестиках пшеницы, ржи или других растений, объекты можно заключить в глицериножелатин.

Приготовление глицериножелатина. Вносят 1 г желатина и 6 мл дистиллированной воды в небольшую колбу. Желатин набухает несколько часов. После этого в колбу добавляют 7 мл очищенного глицерина и кристаллик антисептика. Колбу ставят на горячую водяную баню. Содержимое ее помещивают стеклянной палочкой. Через некоторое время смесь в колбе разжижается. Ее переносят в термостат и фильтруют через бумажный фильтр в горячем виде.

Глицериножелатин может долго храниться в закрытой склянке с корковой пробкой, в которую вставлена стеклянная палочка. При необходимости склянку с глицериножелатином помещают в воду, подогреваемую на водяной бане. Глицериножелатин разжижается, и его используют для приготовления препаратов.

В качестве фиксирующей и просветляющей жидкости берут лактофенол Аммана. В его состав входят 1 ч. молочной кислоты, 1 ч. фенола, 2 ч. глицерина и 1 ч. воды. Красителем служит 1%-й раствор хлопчатобумажного синего, который добавляют в лактофенол.

Последовательность изготовления препаратов. Рыльце с проросшими пыльцевыми зернами помещают на предметное стекло, на которое наносят смесь лактофенола и красителя. Продолжительность одновременной фиксации и окраски 5—10 мин, затем пипеткой удаляют смесь и наносят чистый лактофенол для дифференцировки препарата. После окончательного удаления лактофенола наносят по капле теплого глицериножелатина на предметное и покрывное стекла. Смонтированный препарат быстро застывает. Такие препараты сохраняются от одного года до нескольких лет.

При изготовлении глицериножелатиновых препаратов можно воспользоваться насыщенным раствором метилового зеленого в 50%-м растворе спирта или водным раствором основного фуксина (1 г на 10 мл воды). Любой из этих красителей прибавляют к горячему глицериножелатину (20 капель фуксина на 15 мл глицериножелатина). Пыльцу помещают в центр предметного стекла и для просветления ее прибавляют 6—8 капель спирта для энтомофильных растений и 1—2 капли — для анемофильных. Затем добавляют каплю горячего глицериножелатина с красителем и помешивают пыльцу иглой. Чтобы среда быстро не застыла, стекло проносят над пламенем спиртовки.

В 1965 г. И. Д. Романов применил для изучения пыльцы картофеля следующую методику. Он окрасил сухую пыльцу из пыльников на предметном стекле 0,1%-м спиртовым раствором основного фуксина, который затем отмывал 1—2%-м раствором соды. Влажную окрашенную пыльцу заключал в глицериножелатин.

Глицериножелатиновые препараты широко применяют в анатомических исследованиях, при которых срезы желательно оставить неокрашенными или не проводить через спирты. Окрашенные в глицериножелатине такие срезы быстро обесцвечиваются. В ряде случаев при использовании метиленовой синей, кристаллвиолета, фуксина и других красителей удается сохранить окраску.

Например, чтобы изготовить глицериножелатиновые препараты для наблюдения плазмодесм в порах клеточных стенок

у созревающих семян плодовых и во время выхода семян из покоя с использованием кристаллвиолета, Е. З. Окнина и Е. Н. Барская в 1956 г. готовили следующие реактивы:

первый раствор Люголя, состоящий из 0,75 г йодида калия и 1 г металлического йода, растворенных в 100 мл воды;

два раствора серной кислоты 10%-й и 5%-й;

второй раствор Люголя, состоящий из 1,25 г йодида калия и 1 г металлического йода, растворенных в 100 мл 5%-го раствора серной кислоты;

краситель — 1%-й водный раствор кристаллвиолета, который по каплям приливают к двум-трем каплям 5%-го раствора серной кислоты, пока она не окрасится в темно-зеленый цвет;

закрепляющий раствор, состоящий из 30 мл глицерина, 2 г хлорида цинка, 0,2 г металлического йода и 80 мл воды со следами йодида калия.

Последовательность работы следующая.

1. Свежие срезы помещают в первый раствор Люголя на 5 мин.

2. Переносят срезы в 10%-й раствор серной кислоты на 5 мин, а затем во второй раствор Люголя на 5 мин.

3. Промывают срезы 5%-м раствором серной кислоты 3 раза, до исчезновения желтой окраски.

4. Переносят срезы в краситель на 15—20 мин до просветления его окраски, а затем в закрепляющий раствор.

5. Просматривают срезы в глицерине или глицериножелатине.

ВРЕМЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ.

ПЕРЕВОД ИХ В ПОСТОЯННЫЕ

Фиксация, хранение и мацерация объектов

В микроскопической технике широко применяют *временные давленные препараты*, для изготовления которых не нужны сложная процедура обезвоживания, заключение в промежуточную жидкость, в парафин и получение микротомных срезов.

Давленные препараты необходимы при изучении митоза, кариотипов, хромосомных нарушений в корешках и конусах нарастания стеблей, мейоза в молодых пыльниках.

Наиболее часто для изготовления давленных препаратов используют фиксаторы Карнуа (6:3:1), Ньюкомера (6:3:1:1:1), Баталья (5:5:1:1), уксусный алкоголь (3:1), ледяную уксусную кислоту и др. Когда трудно считать хромосомы или они длинные, применяют специальные методы предобработки, о которых было сказано выше (см. с. 60). Так, для кариологического анализа корни скерды зеленой перед фиксацией обрабатывают 0,05%-м раствором колхицина обычно в течение 2 ч. Кроме кол-

хицина, можно брать насыщенные растворы парадихлорбензола или 0,002 М 8-оксихинолина. Эти два раствора готовят в термостате при 60°C. Для предобработки корней перед фиксацией хорошие результаты дает насыщенный в воде раствор монобромнафталина. Для подсчета числа хромосом возможна фиксация корней при пониженной температуре (2—3°C).

Фиксированный материал хранят в холодильнике в фиксаторе или промывают в 96%-м растворе этилового спирта и хранят в 70%-м его растворе до окрашивания.

При изготовлении давленных препаратов исключительное значение имеют способы мацерации тканей до окрашивания (лат. *maceratio* — размягчение; в данном случае обработка объекта, чтобы вызвать распад ткани на отдельные клетки). Обычно для этого используют 45%-ный раствор уксусной кислоты (для твердых объектов ее подогревают), 40—45%-й — пропионовой кислоты, 1 н. раствор соляной кислоты, различные ферменты (пектиназа, цитаза) и др. Окрашивают препараты ацетокармином, ацетоорсеином, пропионовым гематоксилином и др.

Ниже приведены наиболее распространенные методы приготовления красителей и окрашивания давленных препаратов.

Окрашивание препаратов

Окрашивание ацетокармином, ацетоорсеином, ацетолакмоидом и метиленовой синей.

Приготовление красителей. Ацетокармин. Наиболее распространен следующий метод. Растворяют 1 г (лучше 2—4 г) кармина — красящего вещества, состоящего из карминовой кислоты, — в 45 мл ледяной уксусной кислоты и 55 мл дистиллированной воды. Растворение ведут в колбе с обратным холодильником на водяной бане с подогревом около 3 ч. При отсутствии обратного холодильника в колбу вставляют воронку. После остывания темно-красный раствор кармина фильтруют и помещают в посуду с притертой крышкой. Для работы его наливают в капельницы. Остатки кармина на фильтре можно использовать повторно.

Можно готовить кармин по методу Сноу на этиловом спирте с добавлением HCl. Для этого 4 г кармина сначала растворяют в 15 мл горячей воды и добавляют 1 мл HCl. Остывшую смесь разбавляют 95 мл 85%-го раствора спирта и фильтруют.

Ацетоорсеин. Готовят орсеин из орсина — красящего начала природной краски, получаемой из лишайника. Растворяют 1 г орсеина в 45 мл горячей уксусной кислоты и добавляют 55 мл дистиллированной воды, кипятят на водяной бане 3 ч, остужают и после фильтрации раствор готов к употреблению.

Ацетолакмоид. Растворяют 2 г лакмоида в 100 мл 45%-го раствора уксусной кислоты и кипятят 2 ч в колбе с обратным холодильником. После испарения добавляют уксусную кислоту до первоначального объема. Раствор используют после фильтрации.

Метиленовая синяя. 100—500 мг краски растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

При использовании всех этих красителей в качестве фиксатора для корней чаще всего применяют уксусный алкоголь

(3:1). Если для окрашивания берут ацетоорсеин, ацетокармин или ацетолакмоид, объекты помещают в раствор одного из них, подогревают на спиртовке, доводят до легкого кипения несколько раз, особенно если не была проведена мацерация в HCl.

Корни злаков труднее окрашиваются и мацерируются, поэтому приходится увеличивать время их окрашивания. Так, корни ячменя, пшеницы иногда выдерживают в ацетоорсеине от одних до полутора суток при комнатной температуре.

После этого объект кладут на предметное стекло в каплю 45%-го раствора уксусной кислоты или хлоралгидрата (5 г хлоралгидрата растворяют в 2 мл дистиллированной воды), отделяют конус нарастания, удаляют лишние ткани, накрывают покровным стеклом и фильтровальной бумагой и постукивают сверху спичкой, чтобы уложить клетки конуса нарастания в виде монослоя.

Описанный метод приготовления красителей и препаратов применяют в различных модификациях. Так, можно сохранять фиксированный материал в свежем фиксаторе при температуре 0—3°C, а окраску и мацерацию объектов вести в смеси растворов 2%-го ацетоорсеина и 1 н. HCl в соотношении 9:1 при подогревании или воспользоваться 4%-м ацетолакмоидом и 1 н. HCl (9:1) для мацерации и окраски с последующим перенесением объектов в ацетолакмоид. В некоторых случаях фиксированный материал сохраняют в 70%-ном растворе спирта при температуре 0—3°C и окрашивают в ацетокармине с добавлением железа.

Иногда материал мацерируют не в соляной кислоте, а в ацетокармине или ацетоорсеине, в которых его оставляют на ночь. В ацетолакмоиде материал можно держать двое суток, например корни гречихи.

Готовые препараты можно окантовать расплавленным парафином или превратить в постоянные при помощи сухого льда или жидкого азота (см. с. 103).

Пропионово-гематоксилиновый метод окрашивания по Henderson и Lu. Перед окрашиванием объект мацерируют в 1 н. растворе HCl от нескольких до 30 мин, промывают водой и на несколько минут помещают в 50%-ный раствор пропионовой кислоты.

Приготовление красителя. Растворяют 4 г гематоксилина в 10 мл 96%-го раствора этилового спирта, затем добавляют дистиллированную воду до 100 мл. Раствор оставляют открытым при комнатной температуре для созревания на 2—3 мес. Для ускорения созревания сосуд с раствором красителя можно поставить в термостат при 30—35°C на сутки. Созревший раствор смешивают со 100 мл 50%-го раствора пропионовой кислоты. Допускается смешение свежего раствора с пропионовой кислотой.

Отдельно готовят раствор железозаммонийных квасцов в пропионовой кислоте. Для этого 1 г квасцов растворяют в 200 мл 50%-го раствора пропионовой кислоты.

Известны четыре способа окрашивания. Приведем два из них. Первый способ используют при наличии незрелого раствора кра-

сителя: последний смешивают с квасцами (1 : 1) и используют через сутки или более. При втором способе к 1—2 каплям созревшего красителя добавляют квасцы (1 : 1) и помещают в эту смесь объект на предметное стекло.

Добавление насыщенного раствора ацетата железа в 50%-м растворе пропионовой кислоты способствует усилению окрашивания. Метод применялся для изучения хромосом льна, но используется и в работе с другими объектами.

Окрашивание ацетофуксином. Окрашивают объекты в ацетофуксине в закрытых бюксах в течение 1—3 ч. Давленный препарат готовят в 30%-й уксусной кислоте, которая способствует обесцвечиванию цитоплазмы. Хромосомы окрашивают в темно-фиолетовый цвет.

Приготовление красителя. Растворяют 1 г основного фуксина в 50 мл 40%-го раствора уксусной кислоты. Раствор подогревают до 50 °С для хорошего растворения фуксина, затем охлаждают до 25—30 °С и фильтруют. Объекты фиксируют в 45%-м растворе уксусной кислоты 10—30 мин при 15 °С. Затем помещают в горячий 1 н. раствор HCl на 15—30 с при 60 °С.

Пропионово-лактоидный метод окрашивания по Каптарю. Кончики корней длиной 2—4 мм помещают в пробирку с 5—10 каплями стандартного раствора на 1—2 ч. Затем корни переносят в 0,5 мл 40%-ного раствора пропионовой кислоты, которую доводят до кипения в течение не более 5—30 с для мацерации объекта. После кипения корни переносят на предметное стекло в каплю 40%-го раствора пропионовой кислоты, накрывают покровным стеклом и дают на него. Подсчитывать хромосомы удобнее в корне не в зоне интенсивного деления, а в тех клетках, которые делятся тангентально и поэтому более удобны для подсчета. Они располагаются обычно по периферии препарата.

Приготовление красителя. Для окрашивания временных препаратов с корнями или пыльниками растений готовят смесь такого состава: 5 г лакмонда добавляют к 50 мл 50%-го раствора пропионовой кислоты. Полученный раствор ставят в темное место на 3—5 сут и время от времени встряхивают. Затем его фильтруют и используют в работе как стандартный раствор. Отдельно готовят 40%-й раствор пропионовой кислоты.

Хромосомы окрашиваются при таком способе в коричневый цвет. Контрастность хромосом увеличивается спустя полчаса после приготовления препарата.

Окрашивание реактивом Шиффа. Известны две модификации реакции Фельгена для выявления ДНК: с холодным и горячим гидролизом объектов в соляной кислоте.

Приготовление красителя. При *холодном гидролизе* реактив Шиффа составляют из 97,5 мл дистиллированной воды, 2,5 мл концентрированной соляной кислоты, 0,5 г фуксина основного для фуксинсернистой кислоты, 1,5 г метадисульфата калия ($K_2S_2O_5$) или натрия ($Na_2S_2O_5$). Составные части вносят

в сосуд в указанном порядке без взбалтывания. Закрытый сосуд с реактивом помещают в темное место на двое суток для обесцвечивания раствора.

Подлежащий окраске материал из фиксатора или 70%-го раствора спирта переносят в 1 н. раствор HCl , а затем в разбавленную соляную кислоту (1 ч. концентрированной HCl +1 ч. дистиллированной воды) при комнатной температуре. Время гидролиза корней в HCl от 20 мин (для гороха) до 2 ч (для картофеля). В реактиве Шиффа корни держат 15 мин и более. Потом их переносят в 45%-й раствор уксусной кислоты. Готовят препарат в той же концентрации уксусной кислоты.

При *горячем гидролизе* реактив Шиффа готовят по методу, указанному на странице 91. Порядок работы при этом способе следующий.

1. Материал из 70%-го раствора спирта сначала переносят на несколько секунд в холодный раствор 1 н. HCl , затем на несколько минут в раствор 1 н. HCl с температурой 60°C для горячего гидролиза (6—8 мин — для фиксатора Карнуа или уксусного алкоголя).

2. Снова переносят материал в холодный 1 н. раствор HCl на несколько секунд.

3. Переносят материал в реактив Шиффа на 0,5—1,5 ч (время устанавливают опытным путем).

4. Промывают материал в трех сосудах с сернистой водой по 5—10 мин в каждом.

5. Промывают материал в проточной воде, а затем в 40—45%-м растворе уксусной кислоты.

6. Готовят давленные препараты.

Переносить корни или пылинки из одной жидкости в другую удобно в небольших стеклянных цилиндрах без дна, затянутых с двух концов марлей.

После окрашивания реактивом Шиффа может возникнуть необходимость провести мацерацию растительных объектов. В этом случае, помимо уксусной кислоты, пользуются цитазой из зубной жидкости виноградных улиток.

Зобную жидкость извлекают из улиток *Helix lucorum taurica*, убитых быстрым замораживанием. Очищают ее центрифугированием при 20 тыс. оборотов в минуту в течение 30 мин и хранят в замороженном состоянии при -4°C . Корни, окрашенные по Фельгену, помещают сначала на фильтровальную бумагу, а затем в плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл. В пробирки добавляют цитазу по 0,05 мл на 10 корней (кормовых бобов). Мацерация длится 20 ч при комнатной температуре.

Окрашивание нигрозином. Используют следующую методику мацерации и окрашивания объектов. Готовят смесь концентрированной соляной кислоты и 95%-го раствора этилового спирта (соотношения 1:4, 1:2, 1:1, в зависимости от материала; для нежных объектов — 1:4). В мацерирующую жидкость

при 10—15 °С помещают объекты на 5—20 мин. После промывки в охлажденной воде в течение 30—120 мин их переносят на предметное стекло в каплю 4%-ного раствора нигрозина при температуре 18—20 °С на 2—3 мин.

Приготовление красителя. Готовят нигрозин растворением в кипящей дистиллированной воде. Раствор кипятят 5—7 мин и фильтруют в темноте. Через 10—14 дней краситель готов.

Ускоренный метод приготовления давленных препаратов

Фиксируют материал по Дайеру в смеси этилового спирта, уксусной кислоты, хлороформа и формалина (10 : 2 : 2 : 1) в течение 5 мин.

Мацерацию проводят в растворе 1 н. HCl при 60 °С в течение нескольких минут в зависимости от объекта. Окрашивают объект 2—3 мин в смеси орсеина, молочной и пропионовой кислот. Для этого 2 г орсеина растворяют в 100 мл смеси, состоящей из равных частей молочной и пропионовой кислот, добавив до 45% воды.

Приготовление препаратов из стеблевой меристемы

У злаков корни трудно раздавливаются, а цитоплазма клеток нередко сильно окрашивается ацетокармином. В таких случаях изучение митозов и хромосом можно проводить на стеблевой меристеме.

Колеоптилю (до 1 см) проросшего семени твердой пшеницы обрабатывают по методике Маккья не менее 3 ч 0,3%-м раствором колхицина и насыщенным раствором парадихлорбензола. Фиксируют проростки в уксусном спирте (3 : 1). Затем материал проводят через серию растворов спирта (80, 50, 30%-й), промывают в воде и красят реактивом Шиффа (см. с. 101).

При изучении действия мутагенов на пшеницу в Институте химической физики АН СССР было предложено проводить исследования во время первых митозов в конусе нарастания стебля в фазе колеоптилю.

Порядок работы следующий. Зерновки пшеницы замачивают и ставят в термостат при 25 °С. Через 36—40 ч колеоптилю с щитком семени фиксируют в уксусном спирте в течение 12 ч. Материал хранят в 70%-м растворе спирта со следами цитрата железа. Окрашивают в ацетокармине. Материал можно оставлять на ночь в красителе или нагревать в нем в течение 5—6 мин до легкого вскипания. В 45%-м растворе уксусной кислоты отделяют конус нарастания и раздавливают его под покровным стеклом. Метод используют для изучения хромосомных перестроек в анафазе и митотической активности клеток под действием мутагенов.

Приготовление препаратов из молодых листочков

Фиксируют молодые листочки в фазе наиболее сильного роста. В качестве фиксатора используют уксусный алкоголь. Промывают и сохраняют материал в 70%-м растворе спирта. Для окрашивания листочки помещают в краситель (ацетокармин, ацетоорсеин или ацетолакмид) и доводят до кипения несколько раз. Затем их переносят в 45%-й раствор уксусной кислоты на предметное стекло. От листочка отделяют основание, так как здесь чаще встречаются митозы, а остальную часть удаляют. Основание листочка разрезают на стекле, накрывают объект покровным стеклом и постукивают спичкой сверху. Метод используют в работе со злаками и картофелем. Можно обрабатывать листочки перед фиксацией 0,2%-м раствором колхицина в течение 1—2 ч.

Для изучения хромосом перед фиксацией молодые листочки помещают в насыщенный раствор эскулина на 15—24 ч при 10—12°C, а затем фиксируют в уксусном алкоголе от 3 до 24 ч.

Для окраски и мацерации объекты помещают в смесь 2%-го раствора ацетоорсеина с 1 н. HCl (9:1), подогревают на спиртовке 3—4 с и оставляют в смеси на 30 мин при 30°C. После этого объекты переносят в 1%-й раствор ацетоорсеина на предметное стекло и раздавливают под покровным стеклом.

Перевод временных препаратов в постоянные

Существует несколько методов перевода временных препаратов в постоянные. Наиболее широко распространен метод с использованием твердой угольной кислоты по Конжеру и Ферчайльду. Готовый давленный препарат кладут на ровную поверхность сухого льда на 1—1,5 мин. Покровное стекло становится неподвижным. Скальпелем или лезвием бритвы отделяют его от предметного. Клетки должны остаться на предметном стекле, которое затем последовательно выдерживают по 2—5 мин в 50, 70, 80, 96%-х растворах этилового спирта, абсолютном спирте и в ксилоле. При отсутствии 100%-го этилового спирта можно использовать бутиловый или изобутиловый спирт. Перед ксилолом иногда вводят смесь абсолютного этилового спирта и ксилола. После ксилола препарат заключают в канадский бальзам, используя чистое покровное стекло.

Многие лаборатории применяют для превращения давленных препаратов в постоянные метод с жидким азотом. Для этого в сосуды с жидким азотом вставляют алюминиевый стержень, имеющий небольшой столик. Столик быстро охлаждается, и на его поверхность кладут препараты. В дальнейшем, так же как это было описано выше, отделяют покровное стекло, а предметное стекло проводят последовательно через серию жидкостей, затем препарат заключают в бальзам.

Если нет сухого льда и жидкого азота, для отделения покровных стекол можно воспользоваться более простой методикой. Для ацетокарминовых препаратов берут 10%-й раствор уксусной кислоты. Наливают ее в чашку Петри, кладут туда две спички и на них помещают препарат покровным стеклом вниз. Через 10—15 мин покровное стекло отделяется. Предметное стекло быстро опускают в фиксатор — уксусный алкоголь, а затем последовательно в абсолютный спирт, ксилол и заключают в балзам. Этот метод применяют в различных модификациях.

После окрашивания препаратов по Фельгену и отделения покровного стекла препарат обезвоживают последовательно в крепких спиртах и проводят через ксилол перед заключением в балзам (см. с. 103).

Существует методика перевода временных препаратов в постоянные без удаления покровного стекла путем пропускания с одной стороны покровного стекла и отсасывания с помощью фильтровальной бумаги с другой его стороны последовательно разных растворов: 45%-го раствора уксусной кислоты, смеси спирта и уксусной кислоты (1:2), абсолютного спирта. Можно также последовательно провести спирты разной концентрации, а затем ксилол и балзам. Эту методику применяют в работе с ацетокарминовыми препаратами.

Наиболее просто можно заключить гистологические срезы в сахарный сироп по методике Шалумовича. Метод применяют в работе с ботаническими объектами, в том числе для флуоресцентной микроскопии. Растворяют 25 г сахара в 50 мл горячей воды и выпаривают до $\frac{3}{4}$ объема на водяной бане. После закипания раствора его фильтруют и добавляют кристаллик антисептика — тимола. Полученный сироп в различных модификациях используют для быстрого изготовления постоянных препаратов. К окрашенному объекту после удаления избытка красителя с помощью фильтровальной бумаги добавляют каплю сиропа сбоку покровного стекла или раздавливают объект в капле сиропа. Препарат исследуют сразу или подсушивают его до превращения в постоянный.

Для превращения временных давленных препаратов в постоянные в лабораторной практике можно использовать термо-

электрические охлаждающие столики — приспособления к замораживающему микротому (рис. 34). Они позво-

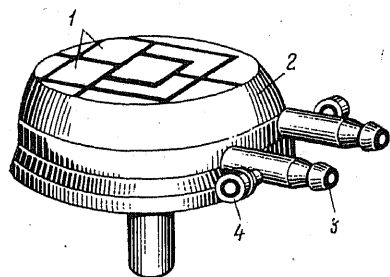


Рис. 34. Термоэлектрический охлаждающий столик (ТОС):

1 — рабочая охлаждающая поверхность; 2 — корпус; 3 — штуцер для подключения воды; 4 — клемма для подключения электрического тока.

ляют замораживать объект без угольной кислоты. ТОС состоит из охлаждающего столика и выпрямителя. Столик охлаждается вследствие того, что постоянный электрический ток, проходя через полупроводниковые элементы, вызывает охлаждение наружных слоев и нагревание внутренних. Чтобы не перегревались внутренние слои, через них пропускают проточную воду.

Для работы столик замораживающего микротомы вынимают из гнезда и на его место вставляют ТОС. На штуцеры ТОС надевают резиновые шланги, один из которых соединяют с водопроводным краном, а другой опускают в раковину. Клеммы ТОС со знаком (+) соединяют с концами выпрямителя, заряженными положительно, а со знаком (—) — с заряженными отрицательно. После этого выпрямитель включают в электросеть.

Температура поверхности столика максимально снижается через 7—12 мин, замораживание срезов происходит за 3—4 мин. После охлаждения столика на его поверхность помещают временный препарат, предварительно подсушенный с боков покровного стекла фильтровальной бумагой для удаления избытка жидкости. Препарат после замораживания снимают и лезвием быстро удаляют с него покровное стекло. Предметное стекло с оставшимися клетками помещают в серию жидкостей: 96%-й раствор этилового спирта, абсолютный спирт и ксилол. Затем препарат заключают в канадский бальзам. По окончании работы выключают выпрямитель, а затем отключают воду.

ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ. КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Гистохимические и цитохимические методы исследований помогают выявлять определенные вещества в тканях и клетках и устанавливать их локализацию. Первые обычно применяют для изучения тканей, вторые — компонентов клетки.

Основоположником микроскопической химии является французский ботаник Ф. В. Распайль (1794—1878 гг.). Одна из первых реакций, получившая широкое распространение в ботанике, была йодная реакция на крахмал.

Гистохимические реакции применяют как на живых, так и на фиксированных объектах с учетом того, чтобы фиксатор не вымывал изучаемые вещества. Для сравнительной оценки микроколичеств вещества используют либо шкалы с оценкой в баллах, либо, если применяются специфические красители, более точные методы цитофотометрии.

Наблюдения цветных реакций при изучении препаратов под микроскопом обычно сопровождают рисунками, на которых концентрацию вещества показывают точками, располагаемыми с различной плотностью. В качестве учебных объектов можно взять лист капусты (поперечные разрезы жилок) и зерновку кукурузы (продольные разрезы зародыша). Можно использовать пыльцу, пестики, эпидермис и другие объекты.

Углеводы

В составе клетки углеводы чаще всего встречаются в виде сахаров в клеточном соке. Они представлены запасными питательными веществами (крахмал) и входят в состав клеточной оболочки.

Качественные реакции на сахара осуществляют на свежем материале. Если необходимо сделать срезы, то они не должны быть тонкими, чтобы можно было выбрать для исследования неповрежденные слои клеток.

Реакция Молиша. Для этой реакции готовят реактивы: 10—15%-й раствор α -нафтола или тимола в 96%-м растворе этилового спирта (1) и концентрированную серную кислоту (2).

Объект помещают на предметное стекло в раствор 1, добавляют 2 капли раствора 2, накрывают покровным стеклом. При наличии глюкозы быстро появляется, в зависимости от реактива, фиолетовая или оранжево-красная окраска. Если реакция наблюдается спустя некоторое время (через 15—30 мин), следовательно, под действием кислоты в глюкозу превратились другие углеводы. Эта реакция не является специфичной.

Определение крахмала. Качественная реакция на крахмал. Одно из самых распространенных веществ в растительной клетке — крахмал. Это соединение обладает двойным лучепреломлением, что делает его удобным объектом для наблюдения в поляризованном свете. Крахмал встречается в виде зерен, имеющих слоистое строение, величина и форма которых неодинакова у различных растений. В клетке он образуется при участии пластид. Характерная особенность этого углевода — то, что он не растворяется в холодной воде.

При просмотре в капле воды крахмальных зерен обращают внимание на их форму, степень выраженности слоистости, положение центра формирования, наличие или отсутствие щелей, тип (простые, сложные и др.), проводят их измерение. В клубнях картофеля крахмальные зерна слоистые, неправильной формы, со смещенным центром, простые, реже сложные, крупные (45—110 мкм). Намного мельче крахмальные зерна эндосперма пшеницы, ржи, гречихи. У бобовых культур крахмальные зерна овальные, с характерной щелью, часто имеющей ветвистую форму.

Наиболее распространенная качественная реакция на крахмал — йодная, в результате которой крахмал окрашивается в сине-фиолетовый цвет. При наличии декстринов или амилопектинов окраска становится красноватой. Для наблюдения реакции необходимо приготовить раствор йода в йодиде калия (см. с. 210).

Методика выявления крахмала для диагностики жаро- и засухоустойчивости растений. В Институте физиологии растений АН СССР было установлено, что в клетках корневого чехлика имеется статолитный крахмал, который исчезает при обезвожи-

вании и нагревании проростков. Показано, что чем выше жаро- и засухоустойчивость растений, тем с меньшей скоростью гидролизует этот крахмал.

Оценку сортов зерновых культур проводят на двухдневных проростках пшеницы, овса, ячменя и проса и трехдневных — кукурузы. Проращивание зерновок ведут при 25 °С в темной камере. Длина корней не должна превышать 1—1,5 см.

Для определения жароустойчивости проростки прогревают в воде в течение 1 ч: проростки овса — при 36 °С, пшеницы — при 37, ячменя и проса — при 37—38, кукурузы — при 39 °С.

Устойчивость растений к потере воды определяют путем обезвоживания проростков в эксикаторах на часовых стеклах над 7,7%-м раствором хлорида натрия для пшеницы, ячменя и овса, 4,6%-м — для проса и 15,9%-м — для кукурузы; экспозиция — 24 ч для ячменя и овса и 48 ч — для кукурузы.

Проверку жизнеспособности клеток корня после прогревания и обезвоживания проростков проводят с помощью нейтрального красного (раствор 1:10 000), окрашивая им корни в течение 2 мин. Плазмоллиз устанавливают в 1 М растворе сахарозы.

Сразу после прогревания и обезвоживания у проростков отрезают кончик главного корня длиной 2—3 мм (у кукурузы предварительно делают продольный разрез посередине корня) и помещают в 1%-й раствор йода в 2%-м растворе йодида калия на 30 с.

Под микроскопом делают глазомерную оценку содержания крахмала по пятибалльной шкале. Балл 5 ставится при максимальном содержании крахмала, 0 — при отсутствии крахмала. Наибольший гидролиз крахмала наблюдается в клетках корневого чехлика незасухоустойчивых и нежароустойчивых сортов.

Определение клетчатки (целлюлозы). *Реакция на одревесневшую клетчатку.* Необходимые реактивы: 0,5—1%-й раствор флороглюцина в 50%-м растворе спирта (1); дымящая соляная кислота (2); глицерин.

Срезы помещают в раствор 1 на предметном стекле, затем оттягивают фильтровальной бумагой этот раствор, добавляют 1—2 капли соляной кислоты и накрывают покровным стеклом. После окрашивания клетчатки в вишневый цвет оттягивают фильтровальной бумагой кислоту и добавляют под покровное стекло глицерин.

Для выявления чистой клетчатки срезы помещают в раствор йода в йодиде калия по Граму (см. с. 210), оттягивают йод и добавляют 33%-й раствор серной кислоты. Под влиянием кислоты клетчатка переходит в амилоид и окрашивается в синий цвет.

Реакция на чистую клетчатку. Оболочка клеток молодых частей растения нередко состоит из чистой клетчатки. Волоски хлопчатника, волокна льна также имеют в составе оболочки почти чистую клетчатку. Наиболее часто для ее выявления исполь-

зуют хлор-цинк-йод, который готовят за несколько дней до проведения определения и хранят в темноте. По Новопокровскому, 20 г хлорида цинка растворяют в 8,5 мл воды при подогревании и получают раствор 1. Затем берут 1,5 г кристаллического йода и 3 г йодида калия и растворяют в 60 мл воды — раствор 2. В раствор 1 добавляют раствор 2 по каплям (около 1,5 мл), встряхивая и следя за появлением осадка.

Перед определением объект смачивают водой, а затем ее удаляют фильтровальной бумагой. После этого наносят каплю хлор-цинк-йода и следят под микроскопом за появлением лиловой окраски.

Определение каллозы. Этот полисахарид представляет собой бесцветное аморфное вещество, нерастворимое в холодной воде и спирте, но легко растворяющееся в крепких соляной и серной кислотах, в 1%-х растворах гидроксидов натрия или калия. Каллоза выявляется в оболочках микроспорозитов и тетрад микроспор в 5—10%-м растворе сахарозы прижизненно, так как отличается от сахарозы показателем преломления. Хлор-цинк-йод окрашивает каллозу в кирпично-красный цвет. Можно приготовить 0,25%-й раствор анилинового синего в 0,15 М растворе K_2HPO_4 (pH 8,2). По И. Д. Романову, в каплю такого раствора помещают содержимое пыльника и добавляют каплю 5—10%-ного раствора сахарозы.

Под микроскопом с осветителем ОИ-18 и светофильтром УСФ-6 наблюдают желто-зеленую флуоресценцию каллозы.

Белки

Белки содержатся в составе цитоплазмы, ядра и различных органоидов.

Биуретовая реакция. Она основана на выявлении пептидных связей, наиболее характерных для белков.

В щелочной среде белки и полипептиды дают окрашенные соединения с ионом меди (розовая, фиолетовая окраска). Необходимые реактивы: 7%-й раствор медного купороса (1), 33%-й или 50%-й раствор NaOH или KOH (2), 5%-й раствор трихлоруксусной кислоты (3). Реакция малочувствительна для небольших количеств белков.

Объекты помещают на 5 мин и более в раствор 1 в часовом стекле, отсасывают раствор. Затем промывают объекты в воде и переносят их на предметное стекло в каплю раствора 2 на 10—60 мин до выявления окраски. Поскольку окрашивание может возникнуть не только в присутствии белков, но и в присутствии таких аминокислот, как аспарагин и гистидин, необходимо предварительно обработать материал трихлоруксусной кислотой, т. е. удалить аминокислоты. Хорошие результаты реакция дает на мезистемах (на примере зародыша).

Фиксация спиртом непригодна для приготовления материала из плодов злаков, содержащих спирторастворимые белки.

Определение основных белков (см. с. 94).

Реакция на суммарные белки с использованием бромфенолового синего. Эта реакция очень чувствительная, ее можно использовать для количественных определений в цитофотометрии. Однако интенсивное окрашивание белков бромфеноловым синим происходит только в присутствии сулемы.

Аминокислоты

Как известно, из аминокислот построены белки. Таким образом, все живые клетки содержат белки, а следовательно, и аминокислоты. Растения способны синтезировать все известные аминокислоты.

Нингидриновая реакция. Необходимые реактивы: 0,5—1%-й водный раствор нингидрина (1); 5%-й раствор трихлоруксусной кислоты (2).

Свежий или зафиксированный спиртом либо 10%-м раствором формалина материал помещают в раствор 1 на предметное или часовое стекло, подогревают до появления синей окраски. Окраска свидетельствует о присутствии аминокрупп.

Обычно эту реакцию ставят в двух вариантах с предобработкой материала трихлоруксусной кислотой в течение 10—15 мин и последующей промывкой водой и без предобработки. Сохранение окраски объекта после обработки кислотой указывает на выявление аминокрупп белка. Реакция без предобработки выявляет все аминокруппы как белка, так и свободных аминокислот. Окрашенное соединение возникает после присоединения азота аминокислоты к нингидрину.

Жиры

Жиры представляют собой глицериновые эфиры жирных кислот. Эти соединения легко растворимы в эфире, ацетоне, слаборастворимы в спирте, нерастворимы в уксусной кислоте. Содержатся жиры в семенах подсолнечника, льна, конопли и других растений, а также в пыльце. В пластидах семян масличных культур происходит как синтез жиров из углеводов, так и обратный процесс. Масла семян растений — это смесь различных жиров, среди которых могут быть специфические жирные кислоты.

Для определения жиров обычно используют судан III, который окрашивает также смолы, воск, кутин, суберин. Эта реакция неспецифична. Жидкие и твердые жиры выявляются через неопределенное время. Быстрее — жидкие жиры.

Готовят раствор: 0,01 г судана III разводят в 6 мл 96%-го раствора этилового спирта и добавляют 5 мл глицерина. Используют и более крепкие концентрации судана III (0,1 г в 20 мл 70—90%-го раствора спирта). Свежий или фиксированный объект, по Левитскому, помещают в раствор судана III. О наличии жиров свидетельствует появление через несколько минут ярко-оранжевой окраски.

Нуклеиновые кислоты

Специфичны для ДНК реакция Фельгена (см. с. 91) и окрашивание галлоцианинхромовыми квасцами после обработки ферментом РНК-азой (см. с. 92). Для выявления РНК можно использовать галлоцианинхромовые квасцы после обработки ферментом ДНК-азой. Эти реакции применяют не только для визуальных наблюдений под микроскопом, но и для количественного определения нуклеиновых кислот при цитофотометрии. ДНК и РНК выявляют также метиловым зеленым и пиронином по Браше (см. с. 93).

Ферменты

Определение фосфатазы. Одни из наиболее распространенных ферментов, участвующих в расщеплении сложных органических соединений, — гидролазы. К ним относятся фосфатазы, гидролизующие эфиры фосфорной кислоты. В процессе дыхания фосфатазы расщепляют фосфорные эфиры сахаров. Наиболее известные фосфатазы — это рибонуклеаза и дезоксирибонуклеаза. Выявляют фосфатазы на свежем материале. В качестве фиксаторов берут 10%-й раствор формалина или 90%-й — спирта.

Реакция на кислую фосфатазу. Необходимые реактивы: 2%-й раствор β -глицерофосфата натрия — 2 мл (1); 0,1 М ацетатный буфер (смесь растворов уксусной кислоты и ацетата натрия в соотношении 4:1), pH 5 — 1 мл (2); 2%-й раствор ацетата свинца — 1 мл (3); 0,5%-й раствор хлорида магния — 1 мл (4); раствор желтого сульфида аммония (5); глицериножелатин (6).

Реакция основана на высвобождении ионов фосфорной кислоты и образовании фосфата свинца, который после обработки сульфидом аммония превращается в коричневый сульфид свинца.

Первые четыре реактива сливают вместе. В смесь помещают объект при 37°C на несколько часов. Затем его следует ополоснуть дистиллированной водой и обработать сульфидом аммония в течение 1—2 мин. Еще раз промыв объект водой, можно заключить его в глицериножелатин.

Определение окислительно-восстановительных (дыхательных) ферментов. *Реакцию на перокси-*

дазу проводят с участием двух реактивов: бензидина или гваякола. Определение жизнеспособности пыльцы по В. С. Шардакову основано на бензидиновой реакции (см. с. 214).

Гваякол представляет собой метилированный фенол, дающий с пероксидазой яркую коричневую окраску. Необходимые реактивы: 0,03%-й раствор перекиси водорода; 0,7%-й раствор гваякола; 25%-й раствор уксусной кислоты. Вначале объект обрабатывают уксусной кислотой, чтобы устранить диффузию продуктов реакции, затем добавляют одну каплю перекиси водорода, гваякол и накрывают покровным стеклом.

Наиболее просто *определить аэробные неспецифические дегидрогеназы* с использованием 0,05%-го раствора метиленовой синей в воде или фосфатного буфера с pH 7,6—8. Свежий материал помещают на 15 мин в раствор красителя. В присутствии ферментов идет обесцвечивание клеток.

Реакция на цитохромоксидазу. Растворить 11,876 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 1 л дистиллированной воды; отдельно растворить 9,078 г KH_2PO_4 также в 1 л воды. Слить растворы в соотношении 1 : 9. Получается фосфатный буфер с pH 5,8, являющийся оптимальной средой для данного фермента. Затем растворяют 0,136 г диметилпарафенилендиамина в 100 мл буфера — получится раствор 1. Отдельно растворяют 0,144 г α -нафтола в 100 мл буферного раствора (2). Растворы 1 и 2 сливают в соотношении 1 : 1 (нади-реактив). Объект помещают в каплю этого реактива. Через некоторое время цитохромоксидаза в присутствии цитохрома с окисляет нади-реактив с образованием индофенолового синего.

Удобны для наблюдений зародыши семян, пестики и другие объекты.

Физиологически активные вещества

К физиологически активным веществам относятся аскорбиновая кислота, гетероауксин, сульфгидрильные соединения, содержащие SH-группы, и др.

Определение гетероауксина. Используют реактив Сальковского, дающий фиолетово-красное окрашивание. Для приготовления его растворяют 0,1 г железоаммонийных квасцов в 100 мл 50%-ного раствора серной кислоты (для нежных объектов этот реактив разбавляют). Объект помещают в реактив Сальковского, осторожно подогревают и следят за появлением окрашивания. Реакция неспецифична.

Определение аскорбиновой кислоты (витамин С). Используют способность кислоты восстанавливать нитрат серебра в темноте. Готовят 5%-й раствор нитрата серебра в 5%-м растворе уксусной кислоты. В него помещают объект на 15—20 мин в темноте. Продукт реакции — черные кристаллы восстановленного серебра.

Вещества вторичного происхождения

Определение дубильных веществ. Эта группа веществ образуется в клеточном соке, неоднородна в химическом отношении и способна давать с растворами солей железа голубовато-черное окрашивание. Используют свежий или фиксированный в формалине материал. Для определения готовят на холоде концентрированный раствор сульфата железа. Препарат с каплей раствора подогревают до 60 °С.

Определение эфирных масел. К эфирным маслам относят различные по химическому составу соединения, но наибольшее значение имеют терпены. Эфирные масла легко растворимы в спирте, уксусной кислоте. Для их выявления используют те же красители, что и для жиров.

Определение алкалоидов. Растения могут содержать различные алкалоиды: никотин, кофеин, соланин, атропин, колхицин, хинин и другие, обладающие ядовитыми свойствами соединения. Чаще всего алкалоиды встречаются у двудольных растений. Эти вещества нерастворимы в воде, но растворимы в спирте.

Для их выявления используют чистую серную или соляную кислоту. Можно брать смесь из 10 капель сильно разведенной соляной кислоты и 20 мл концентрированной серной. Цвет продуктов реакции зависит от природы алкалоидов. В качестве реактивов можно использовать смесь пергидроля и серной кислоты (1 : 10), приготовленную на холоде.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Выявляя те или иные вещества в клетке, нередко приходится давать им количественную характеристику. Особенно часто встает вопрос о содержании в клетках ДНК, РНК, белка и некоторых других соединений. Современные методы количественного анализа включают: цитофотометрию, цитофлуориметрию, цитоинтерферометрию, автордиографию, электронно-микроскопическую цитохимию (табл. 2).

Цитофотометрия, или абсорбционный метод, основана на определении веществ по избирательному поглощению ими света определенной части спектра.

Цитофлуориметрия позволяет определить количество вещества в клетке по интенсивности и спектру его флуоресценции или самого флуорохрома.

Цитоинтерферометрия дает возможность определить сухую массу клетки на основе величины сдвига по фазе проходящего через нее света.

Автордиография основана на введении меченых предшественников в среду, из которой клетка поглощает их и использует для

2. Особенности методов количественной цитохимии

Метод	Определяемое вещество	Краситель, изотоп	Спектральный диапазон	Максимум поглощения (излучения)
Цитофотометрия	ДНК, РНК		УФ	260 нм
	Белки		УФ	280 нм
	ДНК	Фуксин по Фельгену	Видимая часть	560 нм
	ДНК, РНК	Галлоцианин бром-феноловый синий	То же	570 нм
	Белки	Прочный зеленый	» »	635 нм
	Гистоны и протаминны			
Цитоинтерферометрия	Белки (сухая масса клетки)		Видимая часть	
Цитофлуориметрия	ДНК	Акридин оранжевый	То же	530 нм
	РНК	То же	» »	650 нм
	Белки	Проционовый 4 RS	» »	
	Липиды	Проционовый желтый	» »	
Авторадиография	ДНК	H ³ -тимидин		
		C ¹⁴ -тимидин		
	РНК	H ³ -уридин	—	—
		H ³ -цитидин		
	Белки	S ³⁵ -меченые аминокислоты		

синтеза нуклеиновых кислот, белков и других веществ. Препараты покрывают специальной фотоэмульсией, с помощью которой можно обнаружить радиоактивность клетки. По числу зерен восстановленного серебра определяют количественные характеристики радиоактивности.

Электронно-микроскопическая цитохимия позволяет определить сухую массу отдельных органелл клетки по уменьшению интенсивности пучка электронов вследствие рассеяния их атомами органелл.

Цитофотометрия

В основе метода лежит закон Бугера-Бера. Согласно Бугеру вероятность поглощения фотонов света определяется свойствами поглощающего вещества и длиной фотонов, что выражается формулой

$$\Phi = \Phi_0 e^{-K_{\lambda}^h},$$

где Φ и Φ_0 — прошедший и падающий световые потоки; e — основание натуральных логарифмов; K_{λ} — показатель поглощения вещества при прохождении монохроматического света с длиной волны λ ; h — длина пути светового пучка через поглощающую среду (по Ю. Р. Хрусту с соавт., 1978).

По Бэру, K_λ определяется концентрацией поглощающего вещества C и удельным показателем поглощения χ_λ :

$$K_\lambda = \chi_\lambda C.$$

Закон Бугера-Бэра может быть выражен в виде следующих уравнений:

$$\Phi = \Phi_0 e^{-\chi_\lambda C h}$$

или

$$C = \frac{1}{\chi_\lambda h} \ln \frac{\Phi_0}{\Phi}.$$

Величину $\ln \frac{\Phi_0}{\Phi}$ называют *экстинкцией*.

Итак, концентрация поглощающего вещества связана логарифмической зависимостью с ослаблением монохроматического светового потока, проходящего через среду.

Общее количество поглощающего вещества (G) определяют по формуле

$$G = CV = \left(\frac{1}{\chi_\lambda h} \ln \frac{\Phi_0}{\Phi} \right) V,$$

где V — объем объекта.

Учитывая, что $V = hS$, где S — площадь сечения объекта, формула принимает вид

$$G = \left(\frac{1}{\chi_\lambda} \ln \frac{\Phi_0}{\Phi} \right) S.$$

Наличие монохроматического светового потока является необходимым условием в работе. Фотометрируемый участок принято называть *зондом*. В итоге необходимо определить логарифм ослабления монохроматического потока света и площадь сечения объекта. Если значение χ_λ неизвестно, количество вещества G выражают в относительных единицах.

В работе необходимо обратить внимание на коэффициент преломления среды, в которую заключен объект, чтобы свести до минимума неспецифические потери света (для фиксированных объектов лучше брать канадский бальзам), постоянство толщины поглощающего слоя и гетерогенность структуры объектов.

Поскольку спектры поглощения света в ультрафиолетовой части у белков, ДНК, РНК близки между собой, для выявления этих веществ используют специальные красители. Последнее влечет за собой определение не самих веществ, а спектров поглощения красителей, которые расположены в видимой части света.

Особое значение в цитофотометрии имеют фиксаторы. Так,

фиксатор ФСУ, состоящий из формалина, этилового спирта, уксусной кислоты, смешанных в соотношении 3:1:0,3 (при фиксации не более 6 ч), сохраняет ДНК, РНК, белки, а нейтральный формалин при обработке в течение 10—15 ч сохраняет ДНК, РНК, белки и липиды. Однако формалин может изменить массу клетки.

В тех случаях, когда можно сделать выбор в пользу количественного изучения состава объектов на срезах или мазках, предпочтение отдают мазкам. Возможно применение и давленных препаратов.

Цитофотометрия осуществляется следующими методами: фотометрирования большого поля; двухволновым; одноволновым двух площадей; точечным; сканирования; логарифмического экрана.

Наиболее распространен из них точечный, а самый простой — метод фотометрирования большого поля. При точечном методе измеряют поглощение фиксированным зондом, размер которого меньше размера объекта. Затем определяют площадь клетки, чтобы вычислить общее количество вещества в ней. Более точные результаты получают, когда фотометрируют не один, а множество участков в клетке. В развитие этого метода создан метод сканирования, когда последовательно фотометрируют всю площадь клетки. В отличие от перечисленных при работе методом логарифмического экрана изображение клетки и окружающего ее фона проектируется на логарифмический преобразователь светового потока.

Особо следует остановиться на фотографической цитофотометрии. В этом случае объекты фотографируют в монохроматическом свете и изучают негативы одним из указанных выше методов.

Фотографирование ведут на обычном микроскопе с осветителем, используя монохроматор. Микрофотосъемку в желто-зеленых, зеленых и синих лучах осуществляют на пленке Микрат-200, которую проявляют при 18°C, используя проявитель № 2:

метол	8 г
сульфат натрия	125 г
сода безводная	5,75 г
бромат калия	2,5 г
вода	до 1 л

Время проявления 5—6 мин. Закрепителем используют обычный. К фотографированию приступают только тогда, когда подобраны выдержки для фотографирования ступенчатого ослабителя и объекта, режим проявления фотопленки. Сначала на рабочую пленку снимают ступенчатый ослабитель, а затем объект.

Ступенчатый ослабитель представляет собой кварцевое стекло с напыленными на него полосками платины различной тол-

щины. Его применяют в качестве эталона для характеристики контрастности эмульсии при определенной длине светового потока.

Определение концентрации вещества возможно тогда, когда коэффициент контрастности негатива не менее 0,8 и не более 1,8.

Количество поглощающего вещества (G) определяют по формуле

$$G = \frac{(U_0 - U_1)S}{\gamma},$$

где U_0 — усредненное значение плотности почернения негатива для различных точек фона, U_1 — то же, но для объекта (получают эти значения, пользуясь логарифмической шкалой микрофотометра); γ — контрастность негатива; S — площадь объекта.

Для определения площади объекта проектируют его изображение на лист бумаги с помощью фотоувеличителя и контуры обводят планиметром.

Для фотометрирования негативов используют микрофотометр МФ-4, дающий возможность осуществить точечный метод, или метод сканирования.

При работе на микрофотометре МФ-4 негатив помещают на столик между лампой и фотоэлементом. Свет от лампы проходит через объект и попадает на фотоэлемент, возбуждая в нем фототок, который поступает в гальванометр. В зависимости от изменения плотности объекта изменяется отсчет на шкале.

Порядок работы на микрофотометре МФ-4 (контролируют по описанию прибора) следующий.

1. Включение прибора в сеть.
2. На столик между стеклянными пластинками кладут негатив; при появлении на зеленом экране изображения негатива его фиксируют специальными винтами.
3. Передвигают столик на незасвеченный участок негатива.
4. Добиваются появления на логарифмической шкале цифры 0, для чего специальным винтом уменьшают цель экрана.
5. Добиваются, чтобы стрелка на логарифмической шкале совпала со знаком ∞ , для чего тумблером прекращают доступ света к фотоэлементу.

6. Приступают к измерению плотности негатива. Сначала проводят измерения плотностей почернения ступенчатого ослабителя для определения контрастности пленки, а потом определяют почернение фона (U_0) и объекта (U_1).

Для фотометрии и измерения ряда оптических констант можно использовать фотометрическую насадку ФМЭ-1, которая легко комплектуется с микроскопом. В комплект ФМЭ-1 входят пульт управления и блок питания.

Фотометрическую насадку устанавливают в гнездо головки тубусодержателя микроскопа вместо бинокулярной насадки. Окуляр вставляют в специальный патрубков. После настройки в поле зрения окуляра видны одновременно изображение объекта и изображение светового зонда (в виде пятна). В верхней части насадки устанавливают фотоумножитель для преобразования светового потока в электрические сигналы. Работает насадка с монохроматическим светофильтром. Регистрирующим устройством является балансная схема усилителя постоянного тока с измерительным прибором.

Метод работы основан на сравнении показателей микроамперметра, полученных при установке эталона, с показаниями при установке объекта.

Цитоинтерферометрия

Для определения сухой массы клеток и клеточных структур используют несколько методов: автордиографию (с рентгеновской установкой), электронно-микроскопическую цитохимию и интерференционную микроскопию. Последний метод дает возможность работать как с фиксированными, так и с живыми клетками.

В интерференционном микроскопе с ртутной лампой луч расщепляется в определенной точке на два луча: один идет через объект, а второй — через среду. В другой точке оба луча интерферируют одновременно. В результате совпадения фаз результирующее колебание будет иметь двойную амплитуду.

В интерференционном микроскопе используют монохроматическое освещение. При наличии прозрачного биологического объекта лучи будут встречаться после расщепления, имея отличия по фазе, т. е. возникает оптическая разность хода лучей Δ .

Для определения сухой массы (P) используют формулу

$$P = \frac{\Delta S}{100\alpha}, \text{ или } P = 5,5 \Delta S,$$

где S — площадь объекта, α — константа, равная 0,0018.

Для измерения разности хода лучей используют освещение поляризованным светом в интерференционном микроскопе. При отсутствии объекта после интерференции двух лучей возникает линейно поляризованный свет; после прохождения через объект направление поляризованного света меняется на некоторый угол. Для оценки разности хода лучей применяют компенсатор, помещаемый перед фотоумножителем.

Из препаратов в интерферометрии часто используют мазки и следят, чтобы объекты не поглощали свет в диапазоне 546 нм. В качестве заключающей среды можно брать дистиллированную воду и глицерин, если разность хода лучей между объектом и средой превышает длину волны.

В интерференционном микроскопе СИИМ-1 источником света служит ртутная лампа ДРШ-250. Изображение объекта передается объективом в плоскость зоны сканирующего устройства. После зонда изображение проектируется на фотокатод фотоэлектронного умножителя и поступает в фазометр.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ВО ВРЕМЯ ПРАКТИЧЕСКИХ РАБОТ

Техника безопасности — это система технических средств и приемов работы, обеспечивающих безопасность труда. В условиях лаборатории цитологии к ним относятся:

изоляция вредных газов, испаряющихся жидкостей, излучений, легковоспламеняющихся и ядовитых веществ;

исправность электрооборудования (термостаты, плитки, водяные бани, трансформаторы и т. д.), надежно работающий вытяжной шкаф (под тягой находятся газовые горелки, термостат с парафином, готовят реактивы);

бокс для ряда реактивов;

сейф для ядовитых веществ;

посуда с притертыми крышками;

размещение микротомов с ножами в специальных футлярах.

В лаборатории должны быть инструкции по технике безопасности, аптечка, халаты, перчатки, защитные очки, песок, одеяло, огнетушитель.

Следует соблюдать осторожность при работе с реактивами во время их переливания, нагревания, переноса и т. д. В лаборатории нельзя хранить кислоты, эфир, ксилол, бензин и другие легковоспламеняющиеся жидкости. Нельзя работать с неисправными электроприборами.

Запрещается пробовать на вкус реактивы, набирать ртом в пипетки растворы кислот и щелочей, брать голыми руками колбы с кипящими растворами, поднимать корзины с бутылками кислот и щелочей, не проверив надежность их дна.

Работать с ксилолом, хлороформом, формалином, колхицином необходимо в перчатках под тягой.

Спиртовку во время работы ставят так, чтобы пламя не обожгло работающего. Наготове должна быть тряпка, которой можно закрыть спиртовку в случае ее воспламенения.

При матировании предметных стекол с использованием ручного точила и подогревании на спиртовке красителей необходимо надевать защитные очки.

Фрамуги и форточки в лаборатории должны быть открыты для постоянного притока свежего воздуха. Следует иметь также на окнах шторы для затемнения.

Перед уходом из лаборатории выключают газ, электроприборы, свет, проверяют, хорошо ли закрыты водопроводные краны.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ ПО ИЗУЧЕНИЮ КЛЕТКИ

СТРОЕНИЕ КЛЕТКИ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Клетка — это структурная единица, лежащая в основе строения и функционирования организма. Изучение клетки путем использования разных методов наблюдения под микроскопом требует определенных знаний о ее строении, о том, какие структурные компоненты можно увидеть в световой микроскоп, учитывая, с одной стороны, их величину, а с другой — разрешающую способность разных объективов микроскопа и методы исследования.

Известны два типа клеточной организации: прокариоты и эукариоты. Отличия прокариот от эукариот даны ниже на примере бактерий.

По современным представлениям, в клетке растений размером от 20 до 300 мкм принято различать *ядро* и *цитоплазму*, которые, несмотря на резко выраженное функциональное различие, тесно связаны между собой ядерно-цитоплазматическим взаимодействием, и *клеточную стенку*.

При помощи светового микроскопа в цитоплазме можно обнаружить *пластиды*, *митохондрии*, *сферосомы*, *пероксисомы*, *вакуоли*. Электронный микроскоп позволяет изучить ультраструктуру перечисленных компонентов и выявить невидимые в световой микроскоп структуры: эндоплазматический ретикулум, рибосомы, микротрубочки, аппарат Гольджи, лизосомы.

Ядро окружено двумя *мембранами* (наружная связана с эндоплазматическим ретикулумом) и содержит *хромосомы*, *ядрышки*, *ядерный сок* (*кариолимфа*).

Внутренняя среда клетки, в которой находятся все структурные компоненты клетки, называется *гиалоплазмой*. Она представляет собой гетерогенный белковый коллоидный раствор, способный обратимо переходить из геля в золь. В этом растворе содержатся растворимые ферменты, ионы, метаболиты и др. Гиалоплазма объединяет все органеллы и обеспечивает их взаимодействие. Внутриклеточные мембраны создают «отсеки» — *компарменты*, обеспечивающие пространственную организацию внутренних биохимических процессов.

Клетки растительных тканей *тотипотентны* — это означает, что они способны после дедифференцировки, т. е. потери специ-

фических свойств, присущих им в составе тканей, восстановить целый организм в соответствующих условиях со свойственным ему генотипом.

ПОВЕРХНОСТНЫЙ АППАРАТ

В последние годы в цитологии возникло направление, изучающее поверхностный аппарат клетки: клеточную стенку, плазмалемму, периферический слой цитоплазмы с микротрубочками. Функции поверхностного аппарата: барьерная, транспортная и рецепторная.

Клеточная стенка. Формируется в телофазе митоза. Для эмбриональных тканей и растущих клеток характерна первичная клеточная стенка. После прекращения роста клеток на первичную клеточную стенку откладываются новые слои и образуется вторичная клеточная стенка.

В состав клеточной стенки входят целлюлоза, гемицеллюлоза, пектины, белки, липиды, минеральные соединения, лигнин, суберин; на ее поверхности откладываются кутин и воск. Во вторичной клеточной стенке на долю целлюлозы приходится до 90% сухой массы.

На рисунке 35 показаны первичные клеточные стенки, которые под электронным микроскопом представляют собой рыхлую сеть из фибрилл целлюлозы, промежутки заполнены пектином. В просветах фибрилл обнаруживаются *плазмодесмы* — каналы шириной до 1 мкм, при помощи которых осуществляется связь между соседними клетками (методика выявления плазмодесм, см. с. 96). Общее число плазмодесм на одну клетку иногда достигает 1000.

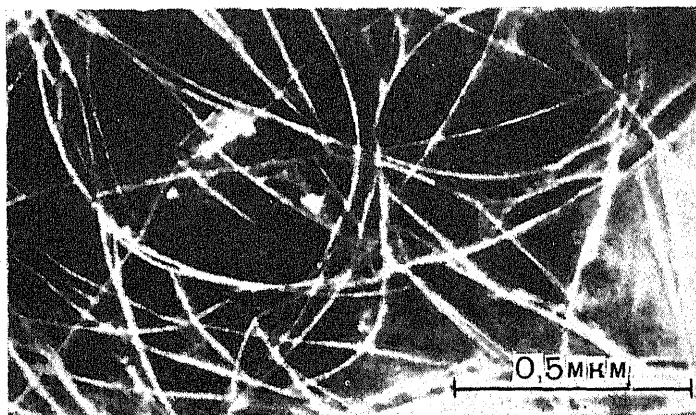


Рис. 35. Элементарные фибриллы целлюлозы в первичной оболочке клетки корня *Allium cepa*. По Мюлеталеру.

Клеточная стенка — продукт метаболизма протопласта. В составе ткани клеточные стенки контактируют друг с другом, образуя единую систему — *апопласт*, способствующий перемещению веществ внеклеточным путем.

Плазмалемма (плазматическая мембрана). Это тонкая полупроницаемая мембрана толщиной 7,5—10 нм, окружающая содержимое клетки.

На основании электронно-микроскопического и рентгеноструктурного анализа возникло представление о том, что плазматическая мембрана состоит из трех слоев: внутренний слой образован двумя рядами молекул липидов; наружные слои — белковые, в них молекулы расположены в один ряд. Другие методы исследования способствовали формированию иных представлений о строении мембраны. Так возникла мозаичная модель, согласно которой глобулы белка располагаются в составе липидов. Есть данные о существовании в мембране протонных и ионных насосов, ферментов и рецепторов.

Плазматическая мембрана полупроницаема. Ее функции: защитная, транспортная — для веществ, поступающих в клетку и выходящих из нее, участие в формировании клеточной стенки и межклеточном взаимодействии. Плазмалемма тесно связана с клеточной стенкой и внутренним содержимым клетки, выполняя рецепторную и осмотическую функции.

Эктоплазма и микротрубочки. Наружный слой цитоплазмы, примыкающий к плазматической мембране, называют *эктоплазмой*. Здесь находятся микротрубочки диаметром 20—25 нм и длиной в несколько микрометров. На поперечном разрезе трубочки полые, толщина их стенки — 5—8 нм, канала — менее 10 нм. Микротрубочкам приписывают различные функции: участие во внутриклеточных перемещениях и морфогенезе, опорную, связь с токами цитоплазмы и др.

ЦИТОПЛАЗМА

Эндоплазматическая сеть. В 1945 г. Портер с соавторами обнаружил в цитоплазме систему взаимосвязанных канальцев и цистерн — *эндоплазматический ретикулум* (ЭР), степень развития которого варьирует в разных типах клеток (рис. 36). Он лучше выражен в дифференцированных клетках. На мембранах эндоплазматического ретикулума имеются различные ферменты, участвующие в метаболических процессах. Общая поверхность ЭР намного превышает поверхность плазмалеммы.

Выявлены два типа ЭР в зависимости от наличия или отсутствия на его поверхности рибосом: шероховатый (гранулярный) и гладкий (агранулярный). С участием рибосом и молекул информационной и транспортной РНК осуществляется синтез белков. Гладкий ЭР принимает участие в синтезе и обмене липидов,



Рис. 36. Электронная микрофотография клетки листового зачатка *Elodea canadensis*:

1 — эндоплазматическая сеть; 2 — рибосомы; 3 — аппарат Гольджи; 4 — пластида; 5 — включения; 6 — клеточная стенка; 7 — плазмалемма.

синтезе и распаде фосфатидов, углеводов и др. Пронизывая всю цитоплазму, он связан и с ядром. Предполагают, что ядерная оболочка — это часть ЭР. Тяжи эндоплазматической сети способны выходить за пределы клетки через плазмодесмы. По ее каналам передвигаются продукты синтеза, образовавшиеся с участием ЭР, и другие вещества.

Рибосомы. В клетках высших растений встречаются рибосомы с разным коэффициентом седиментации. В цитоплазме выявлены рибосомы 80S, в хлоропластах и митохондриях — 70S. Рибосомы 80S имеют в сухом состоянии размеры $24 \times 20 \times 20$ нм.

По имеющимся данным, рибосома состоит из двух неравных субъединиц: 60S и 40S. Основные химические компоненты рибосом — рибосомальная РНК и белок. По современным представлениям, эти органеллы осуществляют сборку специфических белков из аминокислот. От их количества зависит общая интенсивность биосинтеза белка. Обычно в синтезе белковой молекулы участвуют ассоциации из нескольких рибосом, получившие название *полирибосомы*. В цитоплазме рибосомы встречаются на мембранах эндоплазматической сети и в свободном состоянии. Сборка рибосом происходит в ядрышке, откуда они мигрируют, по-видимому, через ядерные поры в цитоплазму.

Митохондрии. Впервые эти органеллы описал Альтман в конце прошлого века, назвав их «биобластами». Термин «митохондрии» ввел Бенда в 1897 г. (греч. митос — нить, хондрион — гранула). Обычно в клетке содержится много митохондрий, которые в совокупности составляют *хондриом*. Митохондрии имеют форму зернышек, палочек или гранул. Их размеры колеблются от 0,2 до 1 мкм в диаметре и до 7 мкм в длину у цилиндрических форм. Подмечено, что число митохондрий зависит от функциональной активности клеток — в стареющих клетках их меньше.

Митохондрии окружены наружной и внутренней мембранами. Последняя имеет большую поверхность за счет образования впячиваний внутрь в виде трубочек, или крист (рис. 37). Между мембранами имеется узкое пространство. На внутренней мембране расположены элементарные частицы, обуславливающие освобождение энергии во время процессов окисления углеводов, аминокислот и жирных кислот. В матриксе митохондрий обнаружены нуклеиновые кислоты, рибосомы, ферменты цикла трикарбоновых кислот и окисления жирных кислот.

В митохондриях синтезируется донор энергии — аденозинтрифосфорная кислота (АТФ), используемая в различных видах клеточной деятельности. Синтез АТФ происходит в результате процессов окисления органических субстратов и фосфорилирования. Главная система превращения энергии в митохондриях — дыхательная цепь переноса электронов, элементы которой находятся во внутренней мембране. В составе дыхательной цепи есть ферменты сукцинатдегидрогеназа, НАД-дегидрогеназа, цитохромы и другие компоненты. В различных точках цепи из аденозиндифосфорной кислоты (АДФ) и фосфата образуется АТФ.

Различают главные и побочные функции митохондрий. Синтез АТФ и обеспечение дегидрогеназами реакций цикла Кребса относят к главным. На мембранах этих органелл протекает также синтез нуклеиновых кислот и белка, обмен жирных кислот, накопление ионов и др.

Наибольшее число митохондрий сосредоточено около ядра и в активных участках клетки. Для прижизненных наблюдений клетки помещают в 0,5 М раствор сахарозы (в воде митохондрии



Рис. 37. Митохондрии эвгленовой водоросли *Astaria longa*.

разбухают) и пользуются фазово-контрастным устройством к микроскопу. Из красителей применяют янус зеленый. Под действием ядов и высокой температуры митохондрии набухают, кроме того, они легко разрушаются спиртом и уксусной кислотой во время фиксации.

Аппарат Гольджи. Еще недавно считали, что аппарат Гольджи — обязательный компонент животной клетки. При помощи электронного микроскопа его обнаружили в растительной клетке (см. рис. 36). В аппарат Гольджи входят: пачки плоских параллельно расположенных цистерн, от которых отходят, образуя сложную сеть, трубочки и пузырьки, замыкающие концы трубочек. В растительных клетках наибольшего развития достигают уплощенные цистерны. Число аппаратов Гольджи на клетку зависит от степени дифференцировки. Число цистерн в аппарате Гольджи неодинаково у разных видов и на разных этапах развития. Есть данные, что во время деления аппарат Гольджи распадается на мелкие элементы, названные диктиосомами (этот же

термин используют в литературе для обозначения пластинчатой формы аппарата Гольджи в отличие от сетчатой).

Д. Н. Насонов, изучая секреторные клетки желез у животных объектов, выявил связь между аппаратом Гольджи и продуктами секреции. Однако у растений мало секреторных клеток и, по-видимому, участие в секреции не единственная функция аппарата Гольджи. Считают, что в аппарате Гольджи протекают лишь окончательная сборка и упаковка секреторируемых веществ. Первые этапы сборки идут на мембранах эндоплазматической сети с участием рибосом. В аппарате Гольджи выявлены ферменты, связанные с синтезом полисахаридов и липидов. Есть данные, указывающие на определенную роль этой органеллы в образовании клеточной перегородки после деления и участия в обособлении ядовитых веществ, попавших в клетку извне, в образовании слизи и муцинов. Возможно, аппарат Гольджи представляет своеобразное мембранное депо клетки, поставляя мембраны для процесса транспорта веществ, клеточной поверхности, лизосом и других структур. Высокая его активность отмечена у растений в растущей пыльцевой трубке.

Лизосомы. Де Дюв выявил в цитоплазме животных клеток лизосомы размером 0,4 мкм. Эти тельца содержат набор ферментов, способных расщеплять белки, нуклеиновые кислоты и другие сложные соединения. Первоначально открытые в животной клетке, лизосомы затем были обнаружены и у растений. Гидролазы (кислая фосфатаза и др.), содержащиеся в лизосомах, проявляют свою активность в кислой среде (рН 5). Лизосомы окружены одной мембраной, и их образование связывают с аппаратом Гольджи. Реакция на кислую фосфатазу позволяет выявить лизосомы в некоторых типах клеток при помощи светового микроскопа.

Пластиды. На свету для зеленых растений характерен автотрофный тип питания. В цитоплазме растительных клеток имеются специфичные для них компоненты — пластиды. В зависимости от окраски или ее отсутствия различают пластиды бесцветные, или *лейкопласты*, зеленые, или *хлоропласты*, и окрашенные в красный, бурый, оранжевый цвет, или *хромoplastы*. Известно, что пластиды могут превращаться из бесцветных в окрашенные, из зеленых в бурые.

Важнейшая функция хлоропластов — участие в процессе фотосинтеза. Для них характерна подвижность. Форма зеленых пластид сильно варьирует, а число их определено для каждого вида растений. У кукурузы хлоропласты имеют форму линзы, диаметр их составляет 5—7 мкм, толщина — 3—5 мкм (рис. 38). В составе хлоропластов, кроме белков и липидов, выявлены пигменты (хлорофилл *a* и *b*, каротиноиды), нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), ферменты, участвующие в фотосинтезе, рибосомы, крахмал.

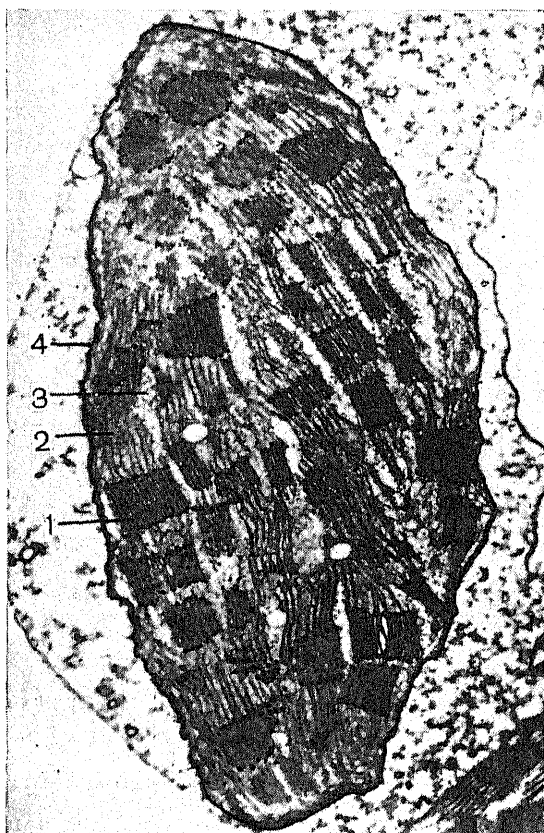


Рис. 38. Хлоропласт кукурузы:

1 — грана, или пачка, тилакоидов; 2 — ламеллы; 3 — строма; 4 — оболочка.

Подмечено, что у полиплоидов хлоропласты крупнее, чем у диплоидов, кроме того, более крупные хлоропласты развиваются у растений в тени.

Большинство авторов отмечают, что хлоропласт окружен двумя мембранами уже на ранних этапах развития. В дальнейшем строма (внутренняя среда хлоропластов) пронизывается системой плоских пузырьков — тилакоидов. Одни тилакоиды тянутся через все продольное сечение пластид — их называют ламеллами строма. Другие, короткие, располагаются параллельно друг над другом так, что образуется пачка тилакоидов — грана, содержащая хлорофилл. На внутренней поверхности тилакоидов имеются *квантосомы*, обладающие АТФ-азной активностью. Граны между собой соединяются при помощи ламелл, или трубочек. Размер

гран 0,3—1,7 мкм. В одном хлоропласте 40—60 гран, а в гране до 50 тилакоидов.

Функции внешней и внутренней мембран неодинаковы, они отличаются по избирательной проницаемости. Во внутренней мембране локализованы системы фотосинтеза и переноса электронов. За счет фотофосфорилирования растения образуют в 30 раз больше АТФ, чем за счет окислительного фосфорилирования в митохондриях. Хлоропласты не способны запасать продукты фотосинтеза на длительное время, а передают их сразу же в другие структуры клетки.

В процессе фотосинтеза происходит поглощение световой энергии пигментами хлоропласта и ее превращение в химическую. Поглощенная энергия передается на *реакционные центры*. Минимальное число молекул хлорофилла с вспомогательными пигментами, обслуживающими реакционный центр, называется *фотосинтетической единицей*. Такая единица содержит у растений 250—400 молекул хлорофилла, вмонтированных в белково-липидную мембрану.

В одном хлоропласте около $2 \cdot 10^6$ активных фотосинтетических центров. Под влиянием поглощенного света в его структурах возникает перенос электронов по электронно-транспортной цепи, сопряженный с образованием АТФ.

Сферосомы. Используя метод наблюдений в темном поле, с фазовым контрастом, можно прижизненно наблюдать в чешуе лука блестящие гранулы, получившие название сферосом. Эти компоненты клетки обнаружил в цитоплазме Ганштейн в 1880 г., назвав их микросомами. Позднее им дали название сферосом. Иногда их называют олеосомами, чтобы подчеркнуть, что в них синтезируются растительные масла.

Сферосомы обладают способностью сильно преломлять свет. Для их окраски можно использовать краситель судан III. Наблюдения показывают, что диаметр этих структур 0,5—1 мкм (рис. 39).

Чаще всего в сферосомах обнаруживают липазу, эстеразу и другие ферменты жирового обмена, указывающие на то, что они являются центром синтеза и накопления растительных масел. По движению сферосом обычно следят за движением цитоплазмы.

Пероксисомы и глиоксисомы. В клетках меристемы корня, побега и листьев ряда растений обнаружены микротельца размером 0,2—1,5 мкм, округлой формы, ограниченные одной мембраной. Обнаружены два типа телец с разными функциями: пероксисомы и глиоксисомы. Первые чаще обнаруживаются в листьях и связаны с хлоропластами. В них идет окисление продукта фиксации CO_2 — гликолевой кислоты в процессе фотодыхания. Фермент каталаза в этих тельцах расщепляет перекись водорода (рис. 40).

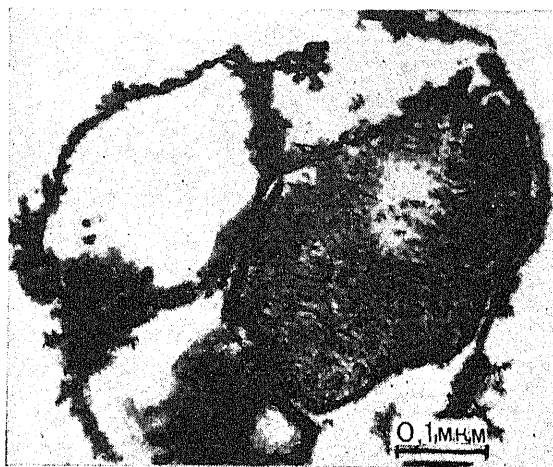


Рис. 39. Сферосомы в колеоризе прорастающей зерновки кукурузы. По Фрей-Висслингу и Мюлеталеру.

Глиоксисомы обнаруживаются в клетках прорастающих семян, запасующих жиры, и содержат ферменты, разрушающие жирные кислоты. В них также присутствуют оксидаза и каталаза.

Вакуоли. Растительные клетки отличаются от животных хорошо развитой системой вакуолей, заполненных *клеточным со-*

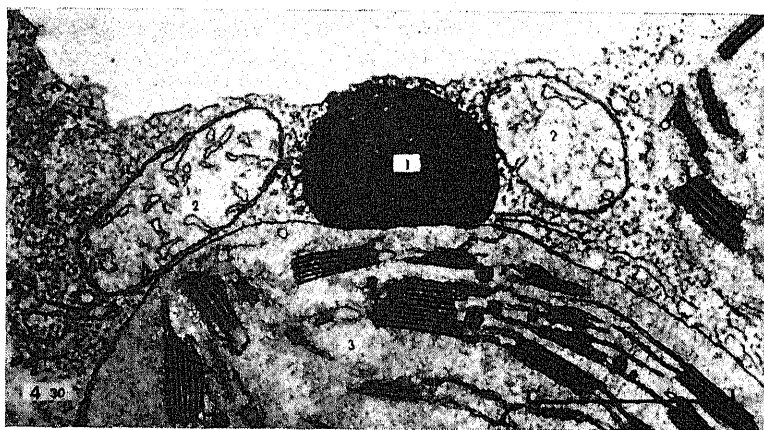


Рис. 40. Пероксисома:

1 — каталаза в пероксисоме; 2 — митохондрии; 3 — хлоропласт табака. По Ж. К. Ролан с соавт.

ком. Вакуоль окружена белково-липидной мембраной — *тонопластом*.

Клеточный (вакуолярный) сок представляет собой водный раствор органических и неорганических соединений. Одни из них участвуют в процессах обмена, другие являются запасными веществами и продуктами обмена. Из неорганических соединений присутствуют соли фосфора, кальция, натрия, калия и др., из органических — алкалоиды, гликозиды, пигменты, дубильные вещества, кислоты, углеводы, белки, пектины и др. В созревающих семенах вакуоли превращаются в алейроновые зерна, которые при прорастании семян вновь преобразуются в вакуоли. Полупроницаемостью тонопласта и плазмалеммы объясняется явление осмоса в клетке.

Вакуоли можно наблюдать в световой микроскоп прижизненно, окрашивая их нейтральным красным. Вакуоли, окрашенные содержащимися в них пигментами, обычно исследуют без применения красителей.

ИНТЕРФАЗНОЕ ЯДРО

Растительная клетка имеет одно ядро, но встречаются и многоядерные клетки. Ядро выполняет генетическую функцию, и с его участием осуществляются важнейшие жизненные функции клетки (рис. 41).

Содержимое ядра состоит в основном из белков и нуклеиновых кислот. ДНК сосредоточена в хромосомах. В ядрах клеток из проростков гороха обнаружено, % массы: ДНК — 14, РНК — 12,1, основных белков — 22,6, прочих белков — 51,3. Для эукариот характерна связь ДНК с гистонами в виде нуклеосом ядра. В них присутствуют различные фракции гистонов: Н1, Н2А, Н2В, Н3, Н4.

Молекулы ДНК несут в себе генетическую информацию. С участием информационной РНК, которая синтезируется на ДНК, как на матрице, происходит синтез белков. В ядрышке синтезируется рибосомная РНК и идет сборка рибосом.

Ядро было открыто в 1833 г. Р. Броуном в клетках тычиночных нитей традесканции. Впоследствии его подробно изучали под световым, а затем и под электронным микроскопом. В классической цитологии при изучении ядра выделяют в качестве составной части *хроматин*. Этим термином определяют участки, способные окрашиваться основными красителями и дающие положительную реакцию Фельгена на ДНК. Под электронным микроскопом в ядре растительной клетки можно различить конденсированный и диффузный хроматин, что отражает характер упаковки хромосомных фибрилл. Более активен в функциональном отношении диффузный хроматин. Ядерный сок не окрашивается

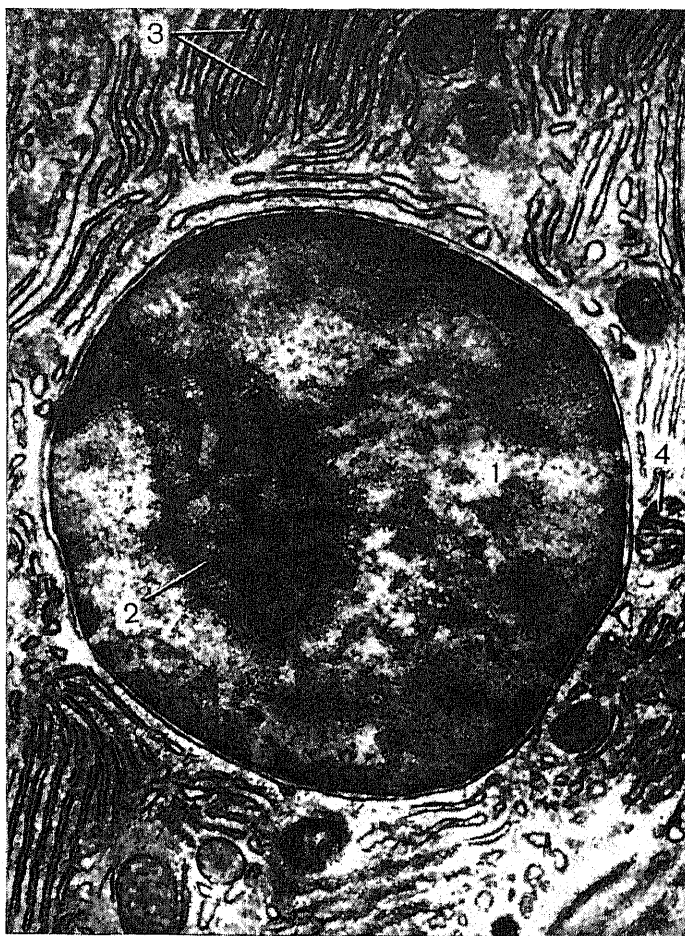


Рис. 41. Фрагмент клетки с ядром:

1 — ядро; 2 — ядрышко; 3 — эндоплазматическая сеть; 4 — митохондрии. По Браше.

этим красителями, поэтому его называют *ахроматиновым веществом*, или *кариолимфой*.

В цитологии существует специальная отрасль знаний о ядре и его компонентах — хромосомах, их структуре и функциях — *кариология*.

Ядерная оболочка. При помощи электронного микроскопа обнаружено, что ядерная оболочка состоит из двух мембран с перинуклеарным пространством между ними. Она пористая и соединяется с эндоплазматической сетью. В процессе

митоза оболочка ядра распадается и формируется вновь. Наружная ядерная мембрана нередко усеяна рибосомами и может давать выросты, связывающие перинуклеарное пространство с каналами эндоплазматической сети. Ядерные поры не являются сквозными отверстиями. В области поры обнаруживается одна центральная и восемь периферических гранул, соединенных нитчатыми образованиями с центральной.

Ядрышко. В ядре может быть 1—2 и более ядрышек, образование которых связано с определенными локусами хромосом (рис. 42), получившими название *ядрышкового организатора*. Основные вещества ядрышка — белки и РНК. Ядрышко не имеет своей оболочки. В начале митоза оно распадается и вновь синтезируется в телофазе.

Кариолимфа. В составе ядерного сока обнаружены ферменты и различные белки, а также продукты деятельности ядрышка и хромосом.

Хромосомы (греч. хромо — цвет, краска; сома — тело, т. е. хромосома — тело, которое сильно окрашивается основными красителями). В растительных объектах хромосомы наблюдал Страсбургер в 1882 г. Термин предложен в 1888 г. Вальдейером. Хромосомы в составе интерфазного ядра находятся в деконденсированном состоянии (лат. *condensatio* — уплотнение; приставка «де» означает здесь отсутствие уплотнения). В составе хромосом различными методами обнаружены ДНК, РНК, гистоны (основные белки), кислые белки, липиды. Из минеральных соединений выявлены ионы кальция и магния. Полагают, что РНК и кислые белки — продукты функциональной активности хромосом и не играют существенной роли в их организации. Основную массу хромосомы составляет гигантская фибрилла ДНП (дезоксирибонуклеопротеид).

Чтобы иметь представление о химическом составе хромосом, можно посмотреть под микроскопом препараты митоза после окраски их по Фельгену для выявления ДНК или фастгрюном для выявления гистонов (см. с. 101).

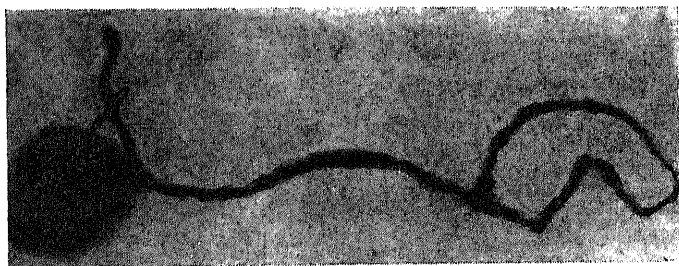


Рис. 42. Пятая хромосома ржи во время конъюгации в пахитене мейоза. Видно ядрышко у ядрышкообразующего локуса.

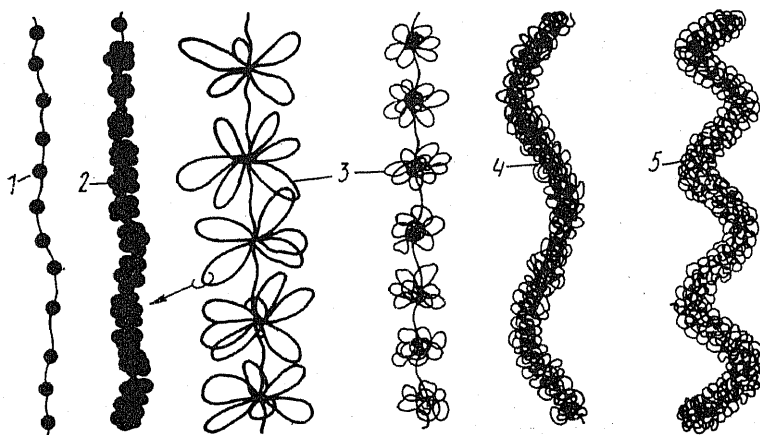


Рис. 43. Схема различных уровней компактизации хроматина: 1 — нуклеосома; 2 — нуклеомер «сверхбусина»; 3 — хромомер; 4 — хромоне-
ма; 5 — хромосома. По Ю. С. Ченцову.

При исследовании клеток дрозофилы, дрожжей, нейроспор обнаружено, что в состав хромосомы входит молекула ДНК, длина которой может достигать нескольких сантиметров, в то время как длина митотической хромосомы составляет несколько мкм. Такое сокращение длины достигается за счет различных уровней компактизации ДНК в хромосоме (рис. 43). Накопленные данные позволяют выделить несколько уровней компактизации: *нуклеосомный*, когда молекула ДНК образует два неполных витка вокруг октамера, состоящего из гистонов Н2А, Н2В, Н3, Н4; *нуклеомерный*, когда 8—10 нуклеосом объединяются в виде глобулы, а ряд сближенных нуклеомеров формируют фибриллу ДНП, в организации которой играет роль гистон Н1; *хромомерный*, или петлевой, когда образуются петли фибрилл ДНП, объединенные скрепками из негистоновых фибрилл (по-видимому, число и размер петель соответствуют числу структурных генов); *хромонемный*, когда сближенные хромомеры образуют нити толщиной 0,1—0,2 мкм — характер укладки этих нитей в теле хроматиды, из пары которых состоит метафазная хромосома, продолжает быть предметом исследований.

Функциональная роль хромосом заключается в кодировании и реализации наследственной информации через процессы репликации ДНК и синтеза РНК. Элементарную единицу репликации в хромосоме называют репликон. В хромосоме эукариот много репликонов.

В хромосомах дифференцированных клеток обнаружена *амплификация* (увеличение) — локальная репликация копий генов рРНК с последующим высвобождением их из хромосомы. Этот

процесс наблюдается в хромосомах типа ламповых щеток и является механизмом повышения синтетической активности в определенный период развития клеток.

СТРОЕНИЕ КЛЕТКИ ГРИБОВ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Клетки мицелия грибов одеты твердой оболочкой, основу которой составляет клеточная стенка, часто покрытая снаружи слизистым слоем — капсулой. Большинство грибов в составе клеточной стенки имеют *хитин* (азотсодержащий полисахарид). В клеточной оболочке могут содержаться пигменты (меланины).

К внутренней стороне клеточной стенки примыкает плазмалемма. В отличие от других эукариот у грибов между клеточной стенкой и плазмалеммой имеются специфические структуры — *ломасомы* — в виде пузырьков.

В цитоплазме клеток грибов есть эндоплазматический ретикулум, рибосомы, аппарат Гольджи, митохондрии, лизосомы, вакуоли. В отличие от высших растений у них нет хлоропластов. В качестве запасных веществ выявляются гликоген в виде гранул, волютин, липиды, иногда кристаллы солей кальция.

Размер ядра — от 2 до 12 мкм (чаще 3—4 мкм). Наиболее мелкие ядра — у головневых грибов. Ядро с ядрышком окружено двумя пористыми мембранами. Особенность клеток грибов — миграция ядер. При митозе сохраняется целостность ядерной оболочки. Клетки могут быть одно-, двух- и многоядерные.

Гифы грибов могут видоизменяться в результате приспособления к выполнению определенных функций. При соприкосновении с субстратом наблюдается образование из них ризоидов, апрессориев, гипофодиев. У грибов-паразитов есть органы питания — гаустории, при помощи которых из клетки растения-хозяина поглощаются питательные вещества. В гаусториях сосредоточено много митохондрий и рибосом.

Установлено, что в клетках листьев пшеницы после проникновения в них гаусторий желтой ржавчины идет распад хлоропластов (с выпадением из них гран), митохондрий, эндоплазматического ретикулума, плазмалеммы и тонопласта, увеличивается объем ядра. Внедрение гаусторий приводит к изменению внутренней организации клетки, в результате чего снижается интенсивность фотосинтеза, нарушается водный баланс, наблюдается разобщение окисления и фосфорилирования, повышается интенсивность дыхания больного растения, увеличивается активность пероксидазы и других ферментов.

У грибов различают вегетативное размножение, бесполое и половое. Последнее сопровождается мейозом. У некоторых гри-

бов отсутствует половой процесс, и рекомбинация генетического материала осуществляется путем митотического кроссинговера в парасексуальном цикле.

МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ

В фитопатологической практике используют живой, фиксированный и гербарный материал для приготовления временных, глицериножелатиновых и микротомных препаратов. Прижизненные наблюдения обычно проводят в капле воды, глицерина, 5—10%-м растворе щелочи. Камеры Ван-Тигема позволяют увеличить продолжительность наблюдений. Например, в капле воды можно смотреть свежий сосок с нижней стороны листьев картофеля, пораженных фитофторозом, или с верхней стороны листьев, пораженных мучнистой росой. Раствор щелочи применяют при просмотре спор грибов. Методы темного поля и фазового контраста позволяют увидеть больше деталей на препаратах. Из красителей для прижизненных наблюдений вакуолей берут нейтральный красный (1 : 1000 и 1 : 10 000).

Для выявления мицелия *по методу Н. А. Наумова* чаще используют 1%-й водный раствор хлопчатобумажного синего (можно брать раствор красителя в молочной кислоте). В таком случае кусочек пораженного листа помещают в краситель на несколько секунд или минут. Наблюдение лучше вести под микроскопом МБС в отраженном свете.

Для окраски мицелия и гаусторий можно применять *метод Кобеля*. Готовят раствор из 0,1 г анилиновой синей, 50 мл молочной кислоты, 100 мл дистиллированной воды. Ткань обрабатывают этим раствором 5 мин, можно при подогреве, промывают и дифференцируют молочной кислотой также с подогревом.

Из других красителей в работе с грибами используют генциановый фиолетовый и метиленовую синюю.

Материал фиксируют неразведенным этиловым спиртом, фиксатором Карнуа, ацетоформолом (100 мл 50%-го раствора этилового спирта, 7 мл формалина, 7 мл ледяной уксусной кислоты) и др. После фиксации его промывают 96%-м раствором спирта и хранят в крепком спирте.

Чтобы зафиксировать материал в культуре, прикладывают покровное стекло к колонии клеток, а затем погружают его в фиксатор, промывают и окрашивают.

Если имеется взвесь спор, то небольшую порцию из нее капилляром помещают в 1—2 капли фиксатора на предметное стекло на несколько минут или дольше, накрывают покровным стеклом. Затем промывают и окрашивают путем протягивания жидкости под покровным стеклом при помощи фильтровальной бумаги. Септориоз злаков можно исследовать *по методу Манжэна*. Для этого кусочек листа фиксируют в абсолютном этиловом спирте

и затем окрашивают 1%-м раствором анилинового синего в молочной кислоте. После промывки объект смотрят в капле молочной кислоты.

Для выявления прорастающих спор на листе можно использовать фиксатор из 9 ч. 95%-ного раствора этилового спирта и 1 ч. уксусной кислоты (при кипячении). Затем объект переносят в раствор хлопчатобумажного синего (в воде или молочной кислоте).

Метод Стоутона. В 5%-м растворе фенола в дистиллированной воде растворяют 0,1 г тионина. Окрашивают в нем объект в течение 1 ч, затем обезживают в серии спиртов и подкрашивают оранжем G в абсолютном спирте. После промывки препарата в 100%-м спирте проводят его через ксилол и заключают в баллам. Гифы грибов окрашиваются в фиолетово-пурпуровый цвет, а ядра становятся пурпурными. Клетчатка окрашивается в желто-зеленый цвет, ядра растительных клеток — в голубой.

Сохранить фиксированный материал можно в смеси спирта, глицерина и воды (1 : 1 : 1) по Кальберлу.

При использовании гербарного материала необходимо до приготовления препаратов размягчить объект путем кипячения в воде или слабом растворе спирта, молочной кислоте и др.

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ БАКТЕРИЙ И ВИРУСОВ

Бактерии — одноклеточные организмы, прокариоты. Длина палочковидных бактерий 1—10 мкм, а диаметр кокков 0,2 мкм. У бактерий различают клеточную стенку, которая может быть окружена капсулой, цитоплазму, нуклеоид (рис. 44). Опорным каркасом клеточной стенки служит гликопротеид муреин. Клеточную стенку отделяет от цитоплазмы цитоплазматическая мембрана, содержащая дыхательную цепь.

В цитоплазме бактерий не обнаружены эндоплазматическая сеть и митохондрии, но имеются рибосомы 70S. У гетеротрофных бактерий есть мезосомы — мембранные структуры — производные цитоплазматической мембраны. Нуклеоид в отличие от ядра высших организмов не окружен ядерной мембраной и не содержит ядрышка, он может быть разветвленной формы, имеет одну хромосому, состоящую из кольцевой ДНК, не связанной с гистонами. У бактерий обнаружены дополнительные генетические элементы, содержащие ДНК в виде плазмид, которые могут быть автономны в цитоплазме или включены в хромосомы. Эта особенность плазмид используется в генной инженерии.

Размножаются бактерии путем простого деления пополам без образования веретена деления. У бактерий открыт и половой процесс в виде *конъюгации*, в которую вступают бактерии с разными

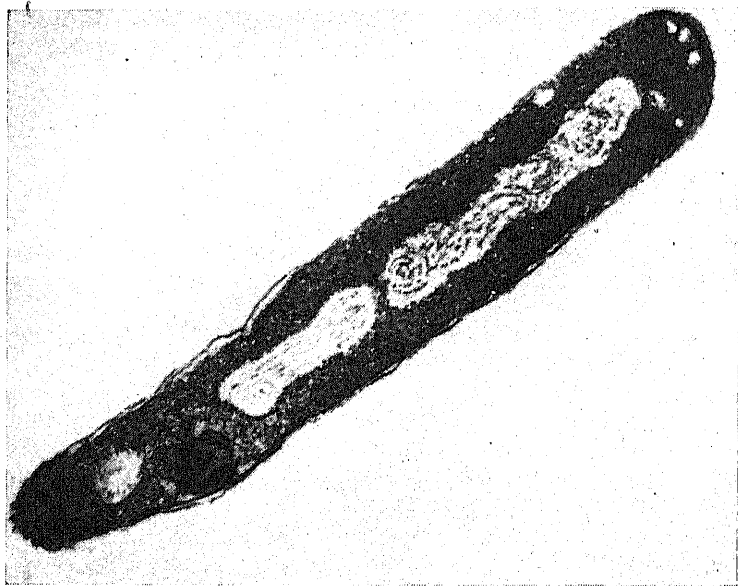


Рис. 44. Бактерия *Escherichia coli*.

ми половыми факторами (например, F^- и F^+). Между конъюгирующими особями образуется тонкий цитоплазматический мостик, по которому от одной бактерии — *донора* к другой — *реципиенту* переходит часть ДНК. В результате образуется неполная зигота, называемая *мерозиготой*.

Вирусы по размеру не крупнее некоторых макромолекул, например диаметр вируса ящура 10 нм, вируса оспы 250 нм. В составе вирусов выявлены нуклеиновые кислоты (ДНК, у растений чаще РНК) и белки. По морфологии их делят на палочковидные (например, РНК-содержащий вирус табачной мозаики и Х-вирус картофеля) и сферические (вирусы оспы, гриппа, ящура, полиомиелита).

Бактериофагами называют вирусы бактерий. Многие из них имеют сферическую форму с отростками (рис. 45). Головка фага, как и других вирусов, представляет собой белковый чехол, под которым находится нуклеиновая кислота. Фаг прикрепляется к бактерии концом отростка, лизирует клеточную стенку и впрыскивает внутрь клетки нуклеиновую кислоту. Размножаются вирусы внутри живой клетки-хозяина, используя его ферменты.

Умеренные бактериофаги могут находиться в длительной взаимосвязи с бактериями. Это явление названо *лизогенией*. В лизогенных клетках генетическая информация фага сохраняется в виде *профага*, который встраивается в хромосому бактерий.

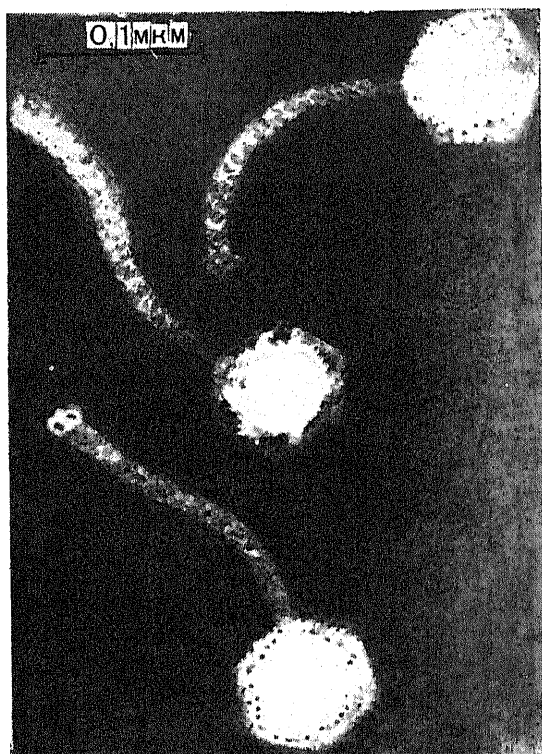


Рис. 45. Фаг № 1 с головкой и отростком. По А. С. Тихоненко.

В интеграции фага и бактерии участвует фермент, детерминируемый фагом. Профаг может придавать бактерии новые свойства. Это явление названо *конверсией*.

МИТОЗ

Клеточное деление относится к числу важнейших биологических процессов, с ним связана передача наследственной информации. Поэтому вопросы, связанные с делением клетки, интересуют цитологов, генетиков и селекционеров.

В пределах ткани обычно различают две популяции клеток: покоящиеся и находящиеся в активном состоянии, т. е. делящиеся или дифференцирующиеся. Начало активным клеткам дают покоящиеся клетки. В них метаболические процессы направлены на самоподдержание и сохранение способности к размножению, а в делящихся клетках — на самовоспроизведение.

Митоз (греч. митос — нить), или непрямо́е деление клеток, у растений наблюдал в 1874 г. И. Д. Чистяков. В 1882 г. его подробно описали: Флемминг — в клетках животных и Страсбургер — в клетках растений. В ходе митоза в ядре происходят сложные структурные преобразования. С генетической точки зрения, он играет важную роль, так как при этом происходит точное распределение генетической информации между дочерними клетками, т. е. осуществляется наследственная преемственность свойств организма и поддерживается непрерывность жизни различных поколений клеток. При нормальном ходе митоза после его завершения из одной клетки образуются две равноценные по генотипу.

Внутри клеточного ядра генетическая информация закодирована в молекулах ДНК, которые упакованы в хромосомы. До наступления деления в интерфазе происходит удвоение структур, ответственных за передачу наследственных свойств, а затем в процессе деления удвоенные структуры точно распределяются между двумя клетками. Последнее приводит к тождественности генетической информации исходных и дочерних клеток.

МИТОТИЧЕСКИЙ ЦИКЛ

Митоз можно изучить, рассмотрев жизненный цикл меристематической клетки, основные этапы которого универсальны для всех клеток, способных к митотическому делению. Такие клетки проходят последовательно интерфазу и митоз, которые тесно связаны между собой. Прежде чем клетка приступит к делению, в ней происходит сложная и длительная биохимическая подготовка. В интерфазе совершаются процессы огромной важности: удвоение ДНК и белков, из которых построены хромосомы, накопление веществ для построения митотического веретена и репродукции центриолей.

Интерфаза — наиболее продолжительная часть митотического цикла. В ней различают три периода: *пресинтетический* (G_1 — от англ. gap — интервал), *синтетический* (S) и *постсинтетический* (G_2), — составляющие вместе с митозом полный митотический цикл. На схеме митотический цикл обозначают в виде замкнутого круга (рис. 46).

В период G_1 в клетке происходят ростовые процессы и накопление предшественников для синтеза ДНК и ферментов, обеспечивающих репликацию, в период S — синтез ДНК и белков, в период G_2 — подготовительные процессы, связанные с формированием митотического веретена и накоплением энергии.

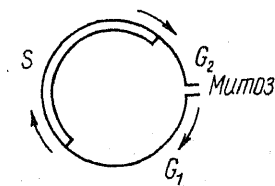


Рис. 46. Схематическое изображение митотического цикла.

Итак, митотический цикл состоит из четырех основных периодов: G_1 , S , G_2 и собственно митоза. Первые три были выявлены в интерфазном ядре при помощи новейших методов исследования, и в первую очередь авторадииграфии. После завершения митотического цикла клетки переходят в следующий цикл или в состояние покоя.

Если новый митотический цикл начинается сразу после окончания предыдущего, он совпадает с жизненным (клеточным) циклом. В зародышах семян некоторых видов растений до 90% клеток находятся в периоде G_1 интерфазы. Однако существуют формы, у которых клетки зародыша находятся в разных периодах интерфазы. Есть данные, согласно которым чем больше продвинутость по клеточному циклу меристематических клеток зародыша и больше активность интерфазного хроматина, тем раньше появляются всходы и выше продуктивность растений. Например, у ячменя семена из средней части колоса содержат больше клеток в G_2 -периоде, чем из других зон колоса, что обеспечивает им более высокие посевные и урожайные качества. Этим же объясняется неодинаковая продуктивность семян одного сорта из различных экологических зон.

Выявлены сортовые отличия семян морозостойких сортов, меристематические клетки которых в основном находятся в G_1 -периоде, в то время как у неморозостойких сортов большая часть клеток — в G_2 -периоде. В данном случае продвинутость по клеточному циклу отрицательно сказывается на морозостойкости.

Для изучения митоза и его отдельных фаз прижизненные наблюдения можно провести на волосках тычиночных нитей традиционной при помощи фазово-контрастного устройства, а также в поляризованном или флуоресцентном свете. В большинстве же случаев для этих целей используют меристематические клетки конуса нарастания корней или стебля после их фиксации и последующего изготовления препаратов. Препараты исследуют на светлом поле микроскопа в проходящем свете.

Наиболее доступные объекты для изучения митоза — корни репчатого лука (*Allium cepa*) и скерды зеленой. После фиксации по Навашину и окраски микротомных препаратов гематоксилином по Гейденгайну на продольных срезах корней можно проследить за интерфазой и всеми фазами митоза, а на поперечных срезах подсчитать число хромосом. Эти препараты очень удобны для зарисовки и микрофотографии. После зарисовки микротомных препаратов необходимо приготовить давленные препараты по методике, приведенной на странице 98.

Постоянный микротомный препарат с продольными срезами корней сначала рассматривают при малом увеличении микроскопа. На кончике корня хорошо заметен чехлик, предохраняющий конус нарастания от повреждений во время роста

в почве. Далее следует конус нарастания корня, или *зона деления клеток* (около 2 мм). За конусом нарастания расположена *зона растяжения*, где клетки вытягиваются в длину, а затем *зона всасывания* с корневыми волосками. Митоз изучают на меристематических клетках конуса нарастания корня, где имеется много делящихся клеток. Меристема состоит из рядов клеток прямоугольной формы. Каждый ряд клеток ведет свое происхождение от одной клетки.

После ознакомления с корнем при малом увеличении препарат нужно рассматривать с объективом 40×.

Интерфаза. На обычных постоянных препаратах интерфазное состояние ядра характеризуется нежной структурой хроматина. Хромосомы в это время сильно деспирализованы и не выявляются. Ядра имеют округлую форму и гомогенную зернистую структуру. Из других компонентов ядра хорошо видны ядрышки. При использовании некоторых ядерных фиксаторов, например Бродского, и окрашивании препаратов гематоксилином можно увидеть с иммерсией под микроскопом (объектив 90×) в ядре растительной клетки хроматиновую сеть и крупные зерна хроматина, образующие *хромоцентры*.

После завершения интерфазы клетки вступают в митоз. Деление клетки обычно начинается с преобразований в ядре.

В профазе (рис. 47) ядро увеличивается, и в нем становятся отчетливо видны хромосомные нити, которые в это

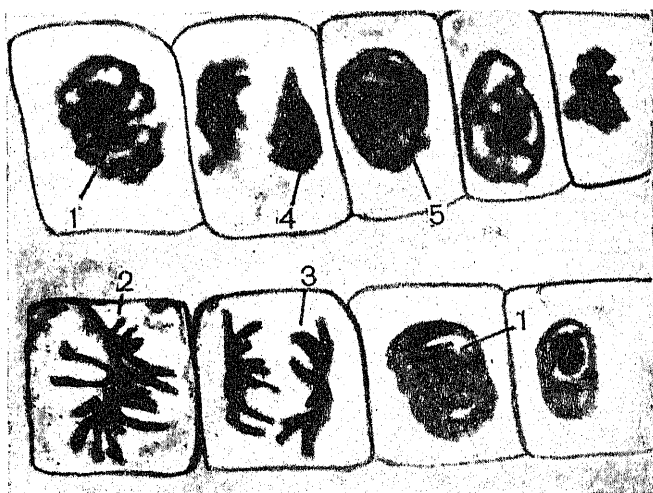


Рис. 47. Митоз в клетках корня лука *Allium cepa* (микротомный препарат):

1 — профаза; 2 — метафаза; 3 — анафаза; 4 — телофаза; 5 — интерфаза.

время уже спирализованы. Каждая хромосома после удвоения в интерфазе состоит из двух сестринских хроматид, соединенных одной центромерой. В конце профазы обычно исчезают ядерная оболочка и ядрышки. На препаратах всегда можно найти раннюю и позднюю профазы и сравнить их между собой. Хромосомные нити более четко видны в поздней профазе, и нередко можно заметить, что они удвоены.

Метафаза. После того как исчезнет ядерная оболочка, видно, что хромосомы достигли максимальной конденсации, стали короче и перемещаются к экватору клетки, располагаясь в одной плоскости. Этот период в митозе называется метафазой. Клетка уже имеет *митотическое (ахроматиновое) веретено*, состоящее из опорных и тянущих нитей. Первые из них протянуты от одного полюса к другому, а вторые связывают центромеры хромосом с полюсами.

На препаратах, окрашенных гематоксилином, нити митотического веретена не всегда видны, так как данный краситель ядерный. Однако в учебном фильме и на других препаратах хорошо видно, что каждая хромосома, будучи прикрепленной к митотическому веретену, состоит из двух параллельно расположенных хроматид.

Удвоенная хромосома в метафазе обычно располагается перпендикулярно нитям митотического веретена и на равном расстоянии от полюсов. Центромеры всех хромосом находятся в одной экваториальной плоскости, что очень удобно для подсчета хромосом и изучения их морфологии.

Микротомные препараты для подсчета хромосом обычно делают с поперечных срезов корней, чтобы метафаза была видна с полюса. В таком положении хорошо видно, что хромосомы располагаются на некотором расстоянии друг от друга. В это время их можно зарисовать и подсчитать.

Анафаза начинается с момента деления центромер, а затем происходит разъединение хроматид. Сестринские хроматиды каждой хромосомы расходятся к разным полюсам. Так происходит точное распределение генетического материала, и на каждом полюсе оказывается такое же число хромосом, какое было у исходной клетки до их удвоения. Например, у ржи в соматических клетках 14 хромосом. В метафазе у нее 14 удвоенных (дихроматидных) хромосом. В анафазе после расхождения сестринских хроматид на полюсах оказывается снова по 14 хромосом.

После разделения центромеры каждая хроматида приобретает функции самостоятельной хромосомы.

Перемещение хроматид к полюсам происходит вследствие сокращения тянущих нитей и удлинения опорных нитей митотического веретена. При просмотре учебного фильма видно, что этот процесс совершается очень быстро по сравнению с дру-

гими фазами и его труднее уловить. Поэтому на препаратах анафаза встречается реже, чем профазы.

В телофазе хромосомы на каждом полюсе претерпевают деконденсацию, т. е. процесс, противоположный происходящему в профазе. Контуры хромосом теряют свою четкость, митотическое веретено разрушается, восстанавливается ядерная оболочка и появляются ядрышки. Таким образом, после различных структурных преобразований произошло разделение исходного ядра на два дочерних. Во время телофазы из фрагмента формируется клеточная стенка, которая делит все содержимое цитоплазмы на две равные части, — происходит *цитокinesis*. Так заканчивается митоз.

О продолжительности отдельных фаз митоза можно судить по прижизненным наблюдениям. Установлено, что в эндосперме гороха профазы длится 40 мин, метафаза — 20, анафаза — 12, телофаза — 110 мин, т. е. наиболее продолжительны оказываются первая и последняя фазы митоза. Весь митоз длится около 3 ч. Продолжительность митотического цикла — в несколько раз больше. Так, у конских бобов (*Vicia faba*) весь митотический цикл длится 30 ч, причем митоз составляет 4 ч, а интерфаза — 26 ч, из которых период G_1 — 12 ч, S — 6 ч, G_2 — 8 ч. У скерды зеленой самый короткий митотический цикл в некоторых клетках длится 8 ч, а большинство клеток проходит его за 10—12 ч. Из трех периодов интерфазы наиболее вариабелен по продолжительности G_1 -период. Кинетика митоза зависит от различных внутренних и внешних факторов, уровня плоидности, рН среды, гормональной активности, температуры, режима освещения и др.

Каждой ткани присущ определенный уровень митотической активности, изменение которого носит четко выраженный ритмический характер. Выявлена суточная и сезонная периодичность числа митозов. В экспериментальной работе нередко приходится учитывать, в какое время суток наблюдается максимальное число митозов в изучаемой ткани. У многих растений максимум митозов отмечается ночью, а минимум — днем. Исследования, проведенные на ячмене в естественных условиях, показали, что максимальное число митозов наблюдается в 18 ч, а минимальное — в 6 ч утра, причем в корневых и стеблевых меристемах максимальное и минимальное число митозов происходит в одно время.

МИТОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТКАНИ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ОТДЕЛЬНЫХ ПЕРИОДОВ И ФАЗ МИТОТИЧЕСКОГО ЦИКЛА

При изучении деления клеток нередко приходится определять *митотическую активность ткани*, т. е. отношение числа клеток, находящихся в митозе, к общему числу клеток исследуемой

ткани. Его можно выразить через показатель, который называется *митотическим индексом*.

Определение митотического индекса. Его устанавливают двумя способами. Первый из них заключается в следующем. На постоянных препаратах с определенного среза изготавливают рисунок. На нем отмечают и подсчитывают все клетки, находящиеся в митозе. Контур рисунка переводят на стандартную бумагу. Рисунок вырезают и взвешивают на торсионных весах. Зная массу 1 см² бумаги, можно определить площадь среза изучаемой ткани. Митотический индекс в этом случае определяют как число митозов на единицу площади ткани.

Чаше митотический индекс выражают в промилле, т. е. числе митозов на тысячу клеток ткани. Для этого на постоянных препаратах подсчитывают число митозов в определенном количестве срезов. Отдельно учитывают общее число клеток на этих же срезах.

Определяют отношение среднего числа митозов к среднему числу клеток в одном срезе и умножают на 1000. В результате такого вычисления митотический индекс (*MI*) выражают в промилле (‰) и определяют по формуле

$$MI = \frac{(P + M + A + T)}{N + P + M + A + T} 1000,$$

где *P* — число клеток в профазе, *M* — в метафазе, *A* — в анафазе, *T* — в телофазе, *N* — в интерфазе.

Для определения митотического индекса пригодны не только микротомные срезы, но и давленные препараты. В последнем случае кончик корня растения с зоной деления клеток после фиксации, мацерации и окраски накрывают покровным стеклом, раздавливают на предметном стекле так, чтобы клетки расположились в один слой, и рассматривают под микроскопом с большим увеличением.

Относительную длительность каждой фазы митоза (%) определяют по другой формуле. Для профазы она выглядит следующим образом:

$$P = \frac{P \cdot 100}{P + M + A + T}.$$

До проведения подсчетов нужно научиться отличать клетки, находящиеся в разных фазах митоза, от неделящихся и клетки зоны деления от клеток других зон по форме и величине.

Результаты подсчетов заносят в следующую таблицу:

Номер поля зрения под микроскопом	Число клеток в				
	профазе (П)	метафазе (М)	анафазе (А)	телофазе (Т)	интерфазе (И)

Определение продолжительности отдельных периодов митотического цикла. Иногда невозможно прижизненно определить продолжительность митоза и интерфазы. Обычно в таких случаях объекты облучают или обрабатывают колхицином. Радиация подавляет митозы. Определяя время, за которое исчезнут все делящиеся клетки, можно установить продолжительность митоза. Обработывая объект колхицином, останавливают митозы в период метафазы. Число остановленных митозов ($MI_{\text{кх}}$) пропорционально митотическому индексу (MI) и времени действия колхицина (A) и обратно пропорционально продолжительности митоза (t_m):

$$MI_{\text{кх}} = \frac{MIA}{t_m}, \text{ отсюда } t_m = \frac{MIA}{MI_{\text{кх}}}.$$

Колхициновый метод может давать завышенные результаты при определении продолжительности митоза, поэтому в каждом конкретном случае нужно выбирать тот или иной метод.

Продолжительность интерфазы можно определить исходя из длительности митоза и общего числа клеток в ткани. Установлено, что отношение числа митозов (n) к числу неделящихся клеток (N) равно отношению продолжительности митоза (t_m) к продолжительности интерфазы (T):

$$\frac{n}{N} = \frac{t_m}{T}, \text{ отсюда } T = \frac{t_m N}{n}.$$

В цитологической практике очень распространен следующий простой способ определения продолжительности митотического цикла. Рассмотрим его на примере скерды зеленой. Проросшие семена с корнями длиной 2—3 мм, т. е. в период, когда в них идут митозы, помещают в чашки Петри с 0,01%-м раствором колхицина и ставят в термостат при температуре 25°C. Через каждые 2 ч корни фиксируют в уксусном спирте и на давленных ацетокарминовых препаратах отмечают появление тетраплоидных клеток. Удобно устанавливать тетраплоидность по метафазе. Если тетраплоидные метафазы наблюдаются спустя 8—12 ч, то и продолжительность митотического цикла составляет 8—12 ч.

Продолжительность отдельных периодов G_1 , S , G_2 в митотическом цикле Квастлер и Шерман определяли при помощи радиоактивных изотопов по изменению процента меченых митозов (рис. 48). Изучаемые объекты инкубируют в среде с H^3 -тимидином, а затем на препаратах следят за появлением меченых митозов. Первые митозы, содержащие радиоактивную метку, будут в тех клетках, которые до инкубации в H^3 -тимидине находились в конце периода синтеза ДНК (S). За среднюю продолжительность постсинтетического периода (G_2) принимают промежуток времени от введения H^3 -тимидина до появления 50% меченых митозов. Количество меченых митозов сначала будет постепенно нарастать, а потом начнет падать. За среднюю продолжительность периода синтеза ДНК (S) принимают время от момента появления первых митозов до начала увеличения количества немеченых митозов. Пройдя весь цикл, клетки приступают к новому делению. Отрезок времени между двумя максимумами меченых митозов соответствует продолжительности всего митотического цикла (T). Продолжительность пресинтетического периода (t_{G_1}) можно определить путем расчета:

$$t_{G_1} = T - (t_S + t_{G_2} + t_M).$$

Кривая изменения процента меченых митозов двухвершинная. Первая вершина отражает первое деление клеток, которые находились в S -периоде, а следующая — второе деление.

Продолжительность митоза t_M определяют колхициновым методом.

ЭНДОМИТОЗ, АМИТОЗ, К-МИТОЗ

Эндомитоз. Наряду с нормальным ходом митоза в клетках встречаются отклонения. Чаще всего это происходит в дифференцированных клетках. Так, если в интерфазе пройдет нормальное удвоение хромосом, но по какой-то причине не образуется веретено деления и не исчезнет ядерная оболочка, то ядро из диплоидного станет тетраплоидным. Это явление называется эндомитозом. В результате него образуются полиплоидные клетки.

При амитозе деление ядра осуществляется в интерфазе (рис. 49). В этом случае интерфазное ядро как бы пере-

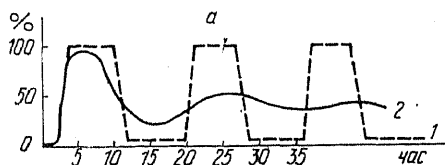


Рис. 48. Изменение количества меченых митозов (%) после введения H^3 -тимидина: 1 — идеальная кривая; 2 — экспериментальная. По Квастлер.

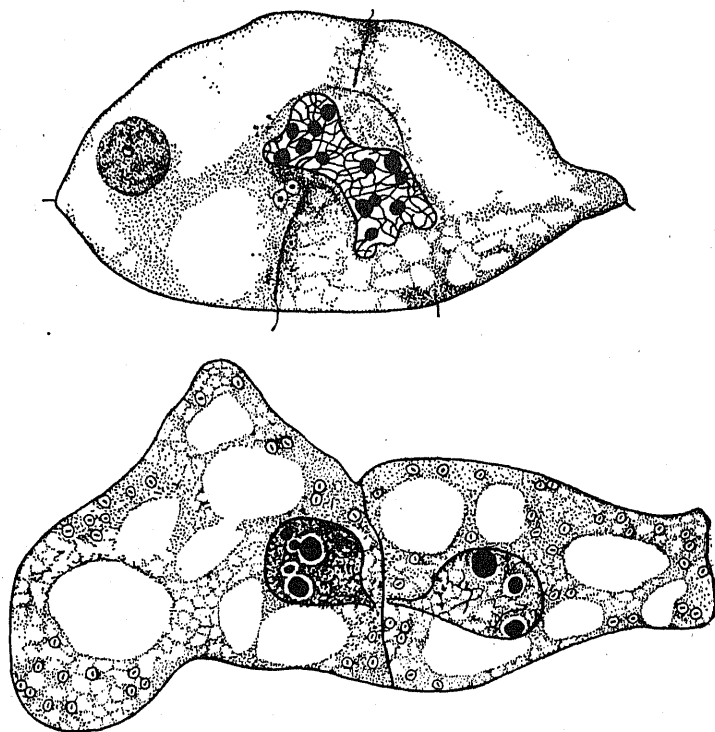


Рис. 49. Амитоз в клетках эндосперма пшеницы.

шнуровывается пополам и принимает форму песочных часов или гантелей. Хромосомы и характерные для митоза структурные изменения в клетке не обнаруживаются, веретено не образуется, ядерная оболочка не разрушается. Описанный тип деления встречается в клетках некоторых специализированных тканей и в патологических случаях.

К-митоз. Под действием облучения и различных ядов также могут возникнуть аномалии митоза. При этом наблюдается повреждение хромосом митотического аппарата, нарушение цитокинеза, что приводит к фрагментации, слипанию, нерасхождению хромосом, образованию мостов, микроядер, многополюсности, асимметрии в митозе, запаздыванию или отсутствию цитокинеза.

К-митоз относится к патологии, связанной с повреждением митотического аппарата (веретена деления, центромер, центриолей). При этом деление клетки останавливается в метафазе. Вызывают К-митоз колхицин, аценафтен, колцемид и другие яды.

В метафазе К-митоза наблюдаются различные отклонения от нормы: хромосомы разбросаны по всей цитоплазме или склеены в виде комковатой массы; иногда их расположение напоминает шар или звезду (в последнем случае центромерные участки всех хромосом сгруппированы в центре, а концы обращены к периферии); в некоторых случаях наблюдается несколько групп хромосом. Под действием колхицина хромосомы конденсируются сильнее, возможны образования микроядер и полиплоидия, задерживается разделение центромер, нарушается цитокинез.

Доза и время обработки ядом влияют на картину К-митоза. Исход деления неодинаков в разных случаях. После действия небольших доз колхицина митоз может восстановиться, при этом не исключено образование полиплоидных клеток. При больших дозах ядов клетки гибнут.

ПЕРВЫЕ МИТОЗЫ

В работе часто приходится сталкиваться с определением первых митозов в корнях. В семенах различных полевых культур, помещенных в благоприятные условия для проращивания, митозы в клетках корня обнаруживаются не сразу. Чтобы зафиксировать появление первых митозов, семена раскладывают на влажную фильтровальную бумагу в чашки Петри при определенной температуре, например 24—25°C, и спустя 1—2 сут или более отмечают появление корней.

Фиксируют корни разной длины, например 2, 5, 10 мм и т. д. Затем промывают их 70%-ным раствором спирта и готовят давленные препараты, чтобы установить, при какой длине корня наблюдаются делящиеся клетки. Так, первые митозы в клетках корня пшеницы происходят при длине его около 10 мм. Можно указать время в часах после замачивания семян. Таким образом устанавливают, через сколько времени после замачивания и в корнях какой длины наблюдаются первые митозы. Существуют и другие методы их определения.

У подсолнечника первые митозы наблюдали в корнях длиной 6—8 мм, у гороха — 10—12 мм, у скерды зеленой — около 2 мм.

Определение первых митозов в корнях проросших семян важно при изучении воздействия мутагенов. Следует заметить, что наличие микроядер в профазных ядрах указывает на то, что данные клетки относятся уже ко второму митозу.

ПАРАСИНХРОНИЗАЦИЯ КЛЕТОК

При помощи ингибиторов синтеза ДНК можно добиться того, что большинство клеток меристемы окажется в одной стадии. Таким ингибитором является 5-аминоурацил (5АУ). Для расте-

ний используют концентрацию 500—800 мкг/мл. Обработку ведут в течение времени, соответствующего клеточному циклу. Клетки оказываются в синтетическом периоде, и после удаления ингибитора они одновременно вступают в период G_2 и другие фазы митоза. Для задержки в метафазе проводят колхициновую обработку за 3 ч до появления максимума митотических клеток.

Нередко синхронизация клеток необходима для воздействия химическими мутагенами и колхицином с целью получения геномных и генных мутаций. Увеличение числа метафаз в клетках корней позволяет ускорить подсчет хромосом. Однако синхронизация увеличивает митотический индекс. Фиксацию материала обычно проводят после достижения максимального митотического индекса.

Синхронизация деления клеток может наступить и под действием пониженных температур. Для этого наклюнувшиеся семена помещают в холодильник на несколько дней при 2—4 °C. Это способствует накоплению клеток, находящихся в стадии профазы. Перенос семян в условия комнатной температуры обеспечивает их переход в метафазу. Температурная синхронизация удобна в тех случаях, когда необходимо получить полиплоиды из ограниченного числа семян.

ХРОМОСОМЫ

МОРФОЛОГИЯ

Хромосомы на протяжении клеточного цикла.

Кариотип, кариограмма и идиограмма. Числа хромосом

Учение о строении и функционировании хромосом называют *хромосомологией*. На протяжении клеточного цикла хромосомы претерпевают ряд изменений, связанных с выполнением различных функций. В рабочем состоянии, когда они выполняют функции репликации и транскрипции, хромосомы находятся в деконденсированном состоянии, что наблюдается в интерфазном ядре. Максимальная конденсация их характерна для делящейся клетки, когда хромосомы выполняют иную функцию — перемещения и разделения наследственной информации. Таким образом, хромосома динамична, т. е. способна менять свою структуру и длину на протяжении клеточного цикла в зависимости от функционирования. В пресинтетический период хромосомы имеют большую длину, чем в митозе. Они образуют группы, ассоциируясь участками, содержащими гетерохроматин.

В синтетический период каждая хромосома ведет себя как полирепликонная структура, имея свой график репликации.

В разных хромосомах синтез ДНК идет асинхронно. По окончании репликации каждая из них становится дихроматидной. Такое состояние сохраняется до анафазы митоза.

Начало митоза сопровождается началом конденсации хромосом. Цикл конденсации хромосом захватывает профазу и раннюю метафазу. Конденсация хромосом также протекает асинхронно. В конце митоза начинается их деконденсация.

Каждому виду свойствен свой *кариотип*, т. е. определенное постоянное число, форма и размеры хромосом.

В диплоидном наборе хромосом соматической клетки (его условно обозначают $2n$) следует различать *гомологичные хромосомы*, т. е. те, которые имеют одинаковую морфологию, но происходят из разных геномов: одна от материнской гаметы, другая от отцовской.

Когда говорят о морфологии хромосом, то принимают во внимание следующие признаки: длину плеч, положение центромеры (кинетохор), наличие вторичной перетяжки, спутника и др. (рис. 50).

Хромосома может иметь один или два спутника. У каждой хромосомы они имеют свою определенную форму, величину и длину нити, соединяющей их с основным телом. Вторичные перетяжки могут быть у одних хромосом на длинном плече, у других — на коротком. В самой хромосоме имеются участки, отличающиеся друг от друга степенью конденсации и функциональной активностью. Так, *гетерохроматиновые участки* (около центромер и вторичных перетяжек) постоянно конденсированы на протяжении всего клеточного цикла и хорошо видны в интерфазе. Такие участки при наблюдении их в интерфазе называют *хромоцентрами*, от других они отличаются по интенсивности окрашивания.

Эухроматиновые участки хромосомы претерпевают конденсацию и деконденсацию. Активность их достигает максимума в интерфазе. Конденсация этих участков в профазе и метафазе митоза сопровождается снижением активности.

Концевые участки хромосом называют *теломерами*. Особенность этих участков состоит в том, что они не способны к соединению с другими участками хромосом.

Нормальная длина каждой хромосомы и суммарная длина всех хромосом кариотипа постоянны. Морфология хромосомы определяется в первую очередь положением центромеры.

Метацентрические хромосомы (М) отличаются тем, что плечи у них одинаковой или почти одинаковой длины. *Субметацентрические* (S) хромосомы имеют плечи разной длины. У *acroцентрических* хромосом (А) центромера расположена вблизи одной из теломер. Для определения уровня неравноплечности устанавливают отношение длины большего плеча к длине меньшего (*плечевой индекс*), что дает возможность

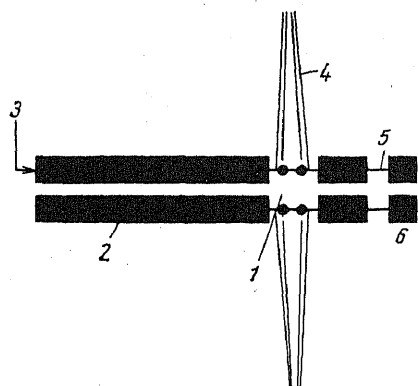


Рис. 50. Схема строения метафазной хромосомы:

1 — первичная перетяжка с центромерой; 2 — длинное плечо; 3 — хроматиды; 4 — нить веретена; 5 — вторичная перетяжка; 6 — короткое плечо. По А. А. Прокофьевой-Бельговской.

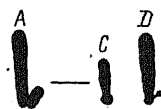
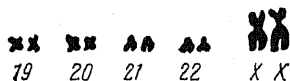
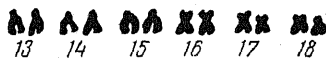
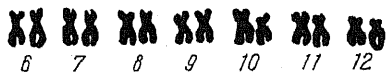
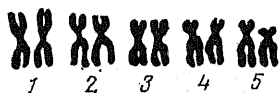


Рис. 51. Хромосомы скерды зеленой. По М. С. Навашину.

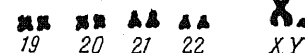
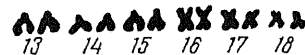
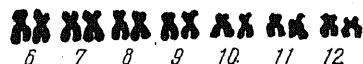
разделить хромосомы на группы. Если отношение длин плеч 1—1,9, хромосомы относят к М-группе; если оно составляет 2—4,9 — к S-группе, при отношении ≥ 5 хромосомы относят к А-группе. Хромосомы, у которых отношение длин плеч более восьми, а форма

короткого плеча напоминает шаровидное тело, называют *головчатými*. Широко используют для классификации хромосом и другой показатель: центромерный индекс (см. с. 161).

В кариотипе скерды зеленой различают две группы хромосом: длинная и короткая хромосомы относятся к S-группе, а хромосома со спутником — к А-группе (рис. 51). На микротомных препаратах корней этого растения хромосома А имеет длину 7,6 мкм; D — 6,2; C — 4,3 мкм. Так как на этих препаратах труднее изучать перетяжки у хромосом, можно использовать давленные препараты с предварительной обработкой кор-



Хромосомы женские

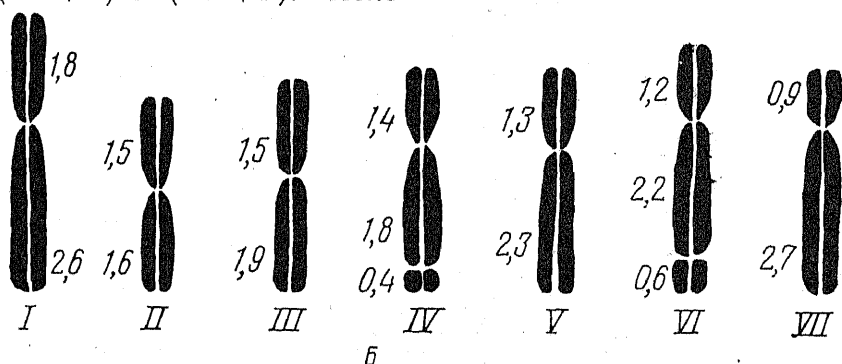
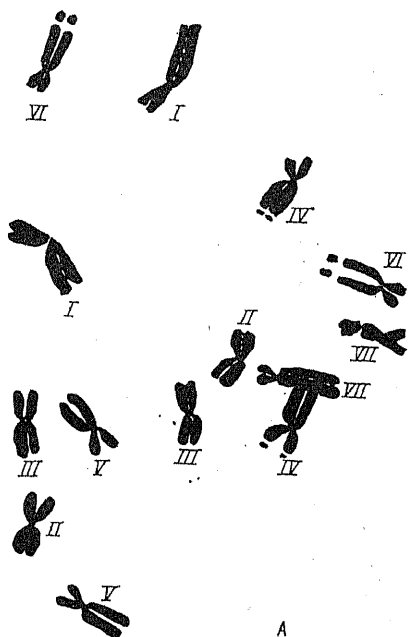


Хромосомы мужские

Рис. 52. Карнограмма хромосом человека ($2n=46$). По А. А. Прокофьевой-Бельговской.

Все хромосомы, входящие в кариотип, можно расположить в виде кариогаммы (рис. 52). Для этого метафазную пластинку с хромосомами фотографируют или готовят рисунок с помощью рисовального аппарата. Ножницами хромосомы вырезаются из фотографии и рисунка, разбиваются на пары гомологов и в ранжирном порядке наклеиваются на лист бумаги.

Гаметы женщины несут хромосомы $(22A+X)$. У мужчин гаметы двух типов: $(22A+X)$ и $(22A+Y)$. Поло-



151

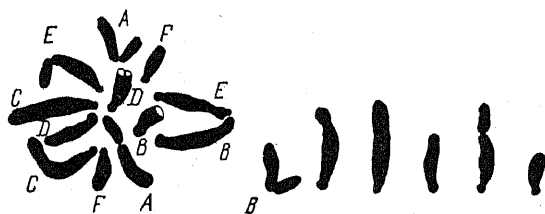
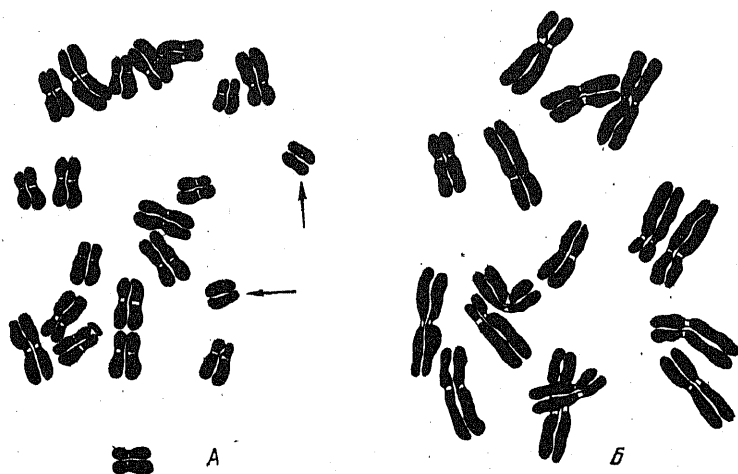


Рис. 54. Хромосомы:

А — кукурузы (*Zea mays*), стрелками отмечены добавочные хромосомы; Б — лука (*Allium cepa*); В — вики посевой (*Vicia sativa*), ($2n=12$); Г — бобов конских (*Vicia faba*). А, Б — по Sutka; В — по И. Н. Свешниковой; Г — по Gopal-Ayenga.

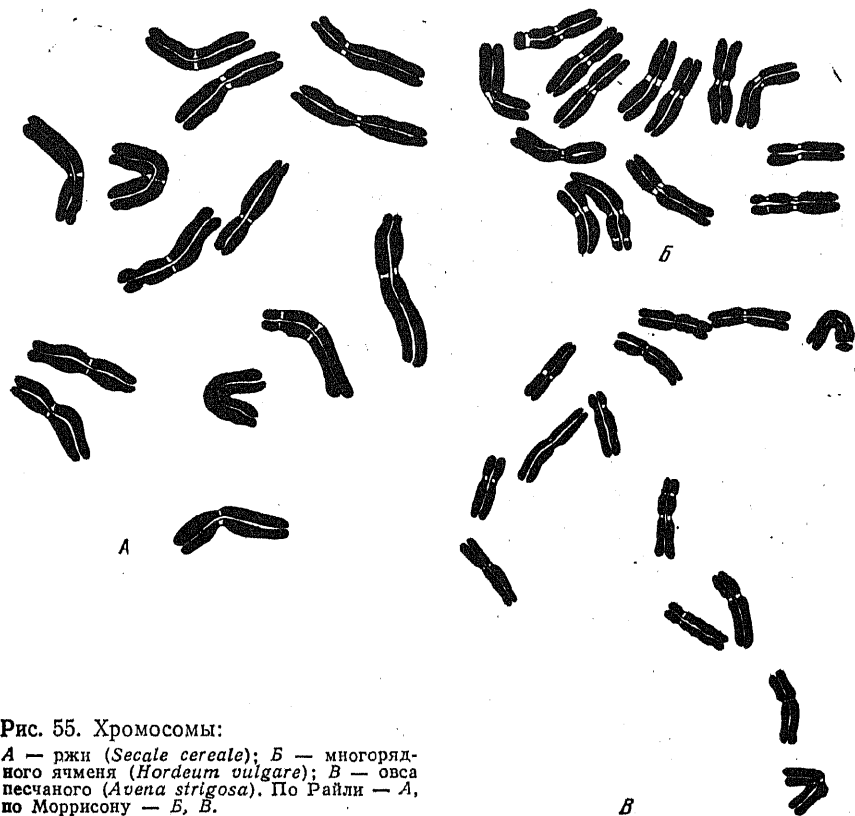


Рис. 55. Хромосомы:

А — ржи (*Secale cereale*); Б — многозерного ячменя (*Hordeum vulgare*); В — овса песчаного (*Avena strigosa*). По Райли — А, по Моррисону — Б, В.

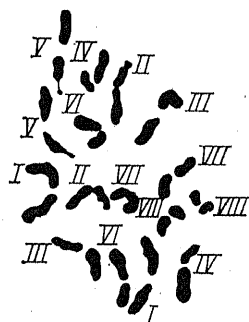
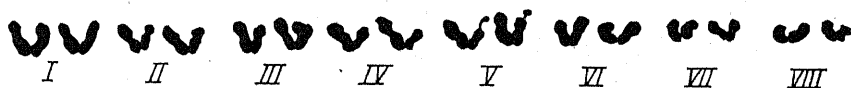


Рис. 56. Хромосомы гречихи культурной (*Fagopyrum esculentum*). По В. В. Мансуровой.



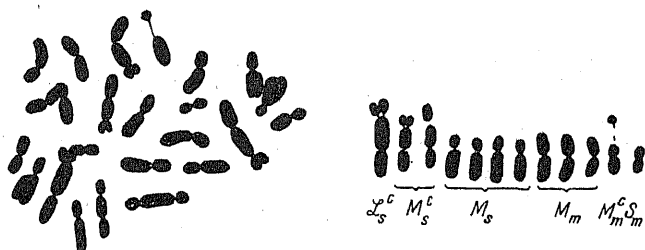
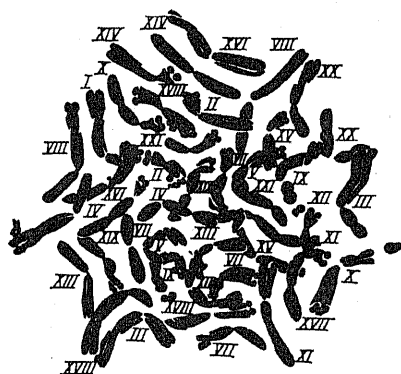


Рис. 57. Метафазная пластинка и идиограмма диплоидного картофеля *Solanum rybinii*:

L_s^c — длинная неравноплечая хромосома со вторичной перетяжкой, центромера субмедианная; M_s^c — средняя неравноплечая хромосома со вторичной перетяжкой, центромера субмедианная; M_s — средняя неравноплечая хромосома, центромера субмедианная; M_m — средняя равноплечая хромосома, центромера медианная; M_m^c — средняя хромосома со спутником, центромера медианная; S_m — короткая равноплечая хромосома, центромера медианная. По Л. И. Абрамовой.



вые хромосомы имеют также двудомные растения (см. с. 237).

В отличие от кариогаммы схематическое изображение хромосом называют идиограммой (рис. 53). Составление идиограммы основано на измерении каждой хромосомы, учете длин плеч, положения центромер, вторичных перетяжек и спутников, что позво-

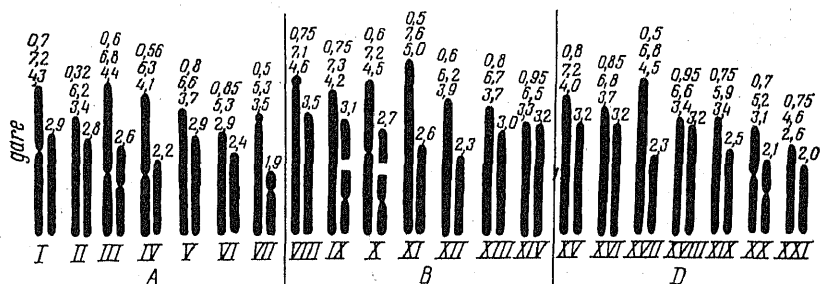


Рис. 58. Ядерная пластинка (вверху) и идиограмма хромосом мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*) с указанием размеров (рис. с микротомного препарата): римские цифры — типы хромосом; арабские цифры: верхний ряд — отношение плеч, второй — общая длина хромосомы в мкм, третий — длина большего плеча, четвертый — длина меньшего плеча; А, В, С — геномы. Увеличение — 2500 раз. По Г. А. Левитскому, М. А. Сизовой и В. А. Поддубной-Арнольди.

ляет более точно идентифицировать хромосомы (см. (с. 161). Удобнее всего для составления идиограммы взять препараты скерды зеленой ($2n=6$).

Следует заметить, что, помимо хромосом основного набора, у растений встречаются добавочные, или *B*-хромосомы, которые обнаружены у 720 видов. Впервые их наблюдали у ржи и кукурузы (рис. 54, А). Число добавочных хромосом варьирует от одной-двух до превосходящего нормальный набор. *B*-хромосомы мельче хромосом нормального набора. Так, у ржи обычные хромосомы имеют длину 7—12 мкм, а *B*-хромосомы — 1,5—2 мкм и мельче. Считают, что *B*-хромосомы образуются от хромосом основного набора путем перестроек. Их присутствие увеличивает генетическую вариабельность популяций.

После ознакомления с хромосомами скерды зеленой изучают препараты с метафазными пластинками различных сельскохозяйственных культур: бобов, вики, лука, гороха, ячменя, овса, пшеницы, картофеля, гречихи и др. (рис. 55—59). Часть из них имеет полиплоидную природу.

У полиплоидов необходимо различать число хромосом в соматических клетках и *основное число хромосом*, обозначаемое *X*. Совокупность последних называют *геномом*. В роде пшеницы известны виды с $2n=14$ (пшеница однозернянка — *Triticum monosocum*), с $2n=28$ (твердая пшеница — *T. durum*) и с $2n=42$ (мягкая пшеница — *T. aestivum*). Все они образуют один полиплоидный ряд. Все числа хромосом этих видов пшеницы кратны основному — семи. Гаплоидный набор хромосом однозернянок (*n*) и основное число хромосом (*X*) состоят из семи хромосом, т. е. гаплоидный набор однозернянки состоит из одного генома, диплоидный — из двух геномов по 7 хромосом. Для определения ploидности клеток число хромосом в соматических клетках делят на основное их число. Так, у однозернянки показатель ploидности равен $14:7=2$, у твердой пшеницы — $28:7=4$, у мягкой — $42:7=6$, т. е. однозернянка — диплоид, твердая пшеница — тетраплоид, мягкая пшеница — гексаплоид. Гаплоидный набор хромосом в гаметах

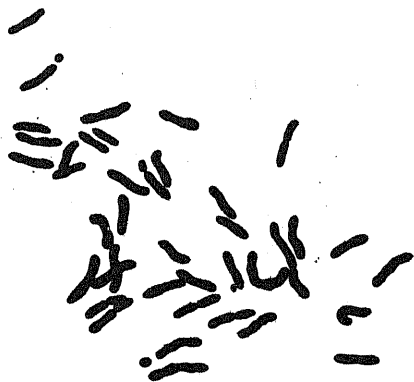


Рис. 59. Хромосомы мягкой пшеницы при увеличении в 750 раз после предварительной обработки корешков бромонафталеном (рисунок с давленного препарата). По Райли с соавт.

твердой пшеницы состоит из двух геномов ($14:7=2$), обозначаемых АВ, мягкой пшеницы — из трех геномов ($21:7=3$), обозначаемых ABD. Виды с 14, 28, 42 хромосомами в соматических клетках обнаружены у розы, земляники и других видов.

Диплоидная сахарная свекла имеет 9 пар хромосом. Если в ее клетках содержится 36 хромосом, а основное их число 9, то, разделив 36 на 9, можно определить, что эта культура представляет собой тетраплоид ($2n=4X=36$). Соматическая клетка тетраплоида имеет четыре генома. У триплоидных гибридов сахарной свеклы в соматических клетках содержится 27 хромосом ($3X=27$).

У диплоидной ржи $2n=2X=14$, у тетраплоидной $2n=4X=28$; у диплоидной гречихи $2n=2X=16$, у тетраплоидной $2n=4X=32$.

Таким образом, диплоиды имеют в соматических клетках $2X$ хромосом, триплоиды — $3X$, тетраплоиды — $4X$ и т. д. При полиплоидии число хромосомных наборов в клетке увеличивается в определенное количество раз и соответственно увеличивается число гомологичных хромосом. Так, при получении тетраплоидов из диплоидов число хромосом и в соматических, и в половых клетках удваивается.

Существуют различные способы удвоения хромосом, но наиболее распространено использование колхицина ($C_{22}H_{25}O_6$). Это вещество выделяют из клубнелуковиц безвременника осеннего или великолепного (*Colchicum autumnale*, *C. speciosum*), относящихся к семейству лилейные. При небольших концентрациях колхицин подавляет в митозе действие веретена. Это приводит к тому, что хромосомы после удвоения не расходятся к полюсам.

Для получения полиплоидов у ржи проростки с coleoptиле и корнями длиной в несколько миллиметров погружают в водный 0,1%-й раствор колхицина на 3 ч при температуре $27^{\circ}C$. Подобная обработка меристемных тканей приводит к удвоению числа хромосом. Полученные проростки выращивают отдельно, а затем устанавливают степень плоидности у образовавшихся из них растений. У арбуза каплю 0,2—0,4%-ного водного раствора колхицина наносят на точку роста молодых проростков в течение четырех дней подряд. Семена картофеля проращивают в чашках Петри на смеси, состоящей из равных частей 0,5%-го раствора колхицина и 2%-го агара. После обработки колхицином семена промывают и высаживают в почву.

Политенные хромосомы и их функциональная морфология

Прекрасный объект для изучения функциональной морфологии — политенные хромосомы из клеток слюнных желез личинок дрозофилы (рис. 60, 61) и комара хирономуса. Хромосомы

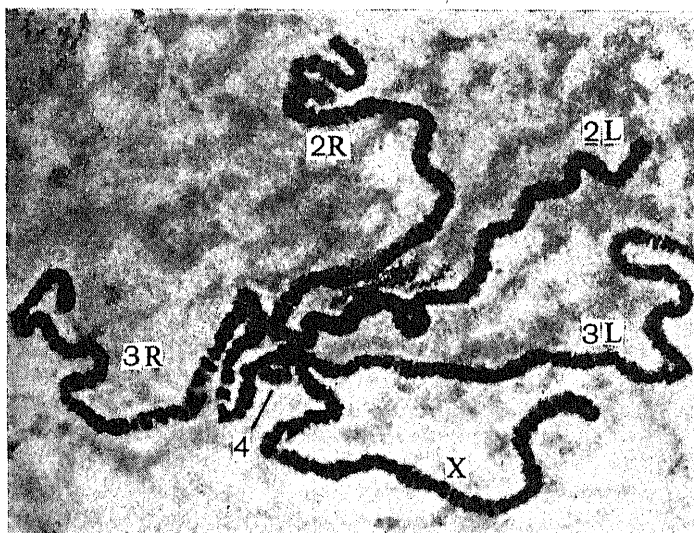


Рис. 60. Политенные хромосомы из слюнных желез самки дрозофилы (*Drosophila melanogaster*). Видны X-хромосома, левое и правое плечо второй и третьей хромосом (2L, 2R и 3L, 3R), а также четвертая хромосома (4). По Мюнтцингу.

в этих клетках отличаются крупными размерами. Каждая политенная хромосома состоит из множества хромомер, возникших в результате многократной эндорепликации. У дрозофилы хромосомы слюнных желез после 11 актов репликации могут иметь до 1000 нитей. У комара хирономуса редупликаций еще больше.

В ядрах антипод зародышевого мешка пшеницы и ячменя также обнаружены политенные хромосомы.

Политенные хромосомы дрозофилы сильно деконденсированы, и гомологичные хромосомы находятся в состоянии *соматической конъюгации*. В клетках вместо диплоидного оказывается гаплоидное число хромосом. Хромосомы имеют четкий рисунок вследствие определенного расположения дисков и междисковых пространств. Диски образованы хромомерами многих хромомерных нитей.

В процессе активного функционирования отдельные участки хромосом теряют дискоидальное состояние, сильно набухают, нити еще сильнее деконденсируются и на месте дисков образуются временные вздутия (пуфы). С их образованием связано усиление синтеза информационной РНК. Каждый диск образует пуфы в определенное время, т. е. существует своего рода «расписание» работы участков хромосомы.

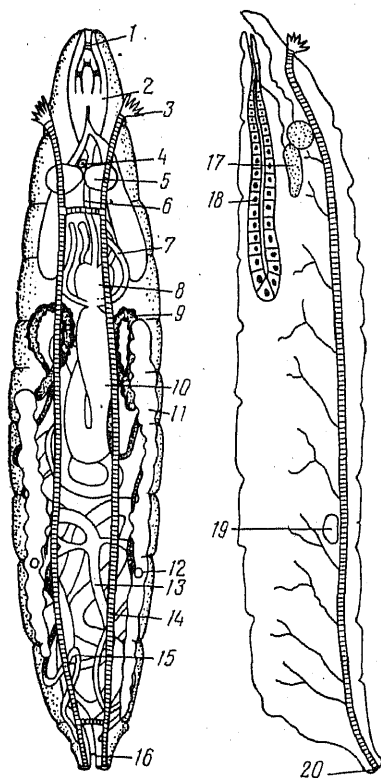


Рис. 61. Схема расположения органов у личинки дрозофилы:

1 — ротовые крючки; 2 — глотка; 3 — переднее дыхальце; 4 — кольцевая железа; 5 — мозг; 6 — пищевод; 7 — желудочная область; 8 — преджелудок; 9 — передняя мальпигиева трубка; 10 — средняя кишка; 11 — жировое тело; 12 — яичник; 13 — задняя кишка; 14 — трахея; 15 — задняя мальпигиева трубка; 16 — анус; 17 — брюшной ганглий; 18 — слюнная железа; 19 — семенник; 20 — заднее дыхальце. По Н. П. Дубинину.

Пуфы, как участки активно работающих генов, вызвали большой интерес в цитогенетике в связи с изучением дифференциации клеток. В различных тканях и органах одного и того же организма число и место образования пуфов у хромосом неодинаковы.

У дрозофилы на стадии личинки выявлено до 108 пуфов, но они работают не синхронно. В каждой стадии развития вздутия образуются в определенных местах. Изучение работы пуфов в свете теории дифференцирования клеток по Бовери предполагает, что все клетки организма, несмотря на одинаковую генетическую информацию, отличаются по активности раз-

ных участков хромосом. Это в какой-то степени объясняет специфику дифференцированных тканей.

С политенными хромосомами дрозофилы или хирономуса знакомятся, приготовив давленные препараты по методике, которая приведена ниже.

Приготовление ацетокарминовых препаратов для изучения гигантских хромосом из слюнных желез дрозофилы

Drosophila melanogaster имеет $n=4$. При разведении дрозофилы в лабораторных условиях при температуре 24—25°C цикл ее развития от яйца до взрослой мухи проходит за 10 сут. Развитие яйца длится 20 ч, а развитие личинки и куколки — 8 сут, из которых половина приходится на личиночную стадию, а половина — на стадию куколки. Для приготовления препарата с хромосомами дрозофилы берут личинку на поздней стадии развития (четырёхдневную), когда она стала подвижной, но еще не окуклилась. Такую личинку на ночь можно оставить

в помещении при температуре около 10°C, что облегчает потом выделение желез. До начала приготовления препаратов знакомились с расположением органов у дрозофилы (см. рис. 61).

Последовательность работы следующая.

1. Личинку помещают на предметное стекло в каплю физиологического раствора или раствора, содержащего 0,73% NaCl.

2. Предметное стекло вместе с объектом устанавливают на столик микроскопа МБС-1, МБС-9 или бинокулярной лупы.

3. Берут в каждую руку по препаровальной игле. Иглой, находящейся в левой руке, сильно прижимают к стеклу ротовую часть личинки (ротовая часть имеет черное хитиновое образование). Второй иглой, находящейся в правой руке, давят плашмя на середину тела и оттягивают задний конец личинки. После разделения тела дрозофилы на две части можно увидеть железы, состоящие из прозрачных клеток, внутри которых находятся ядра с лентовидными образованиями — хромосомами.

4. Убирают со стекла лишние ткани, отделяют жировое тело, подцепляют железу на кончик иглы и переносят на часовое стекло с ацетокармином на 15—20 мин. Для лучшего окрашивания часовое стекло накрывают другим стеклом и помещают в термостат.

5. На предметное стекло в каплю с 45%-м раствором уксусной кислоты переносят железу из ацетокармина. Закрывают покровным стеклом и давят сверху. Временный препарат можно окантовать расплавленным парафином и перевести в постоянный, используя сухой лед.

Гигантские хромосомы из слюнных желез дрозофилы имеют ряд особенностей. Гетерохроматиновые участки всех хромосом объединяются в один *хромоцентр*, причем у самцов *Y*-хромосома входит в хромоцентр и не видна.

На препаратах политенных хромосом дрозофилы выявляется их поперечная исчерченность, видны темные и светлые полосы. Для распознавания хромосом и полос существует система обозначения. Цифрой 1 обозначают *X*-хромосому, цифрой 2 — вторую хромосому, символами *2L* и *2R* — ее левое и правое плечо, цифрой 3 — третью хромосому, а символами *3L* и *3R* — левое и правое плечо этой хромосомы, цифрой 4 — четвертую хромосому. Наиболее длинные вторая и третья хромосомы. Наименьшие размеры имеет четвертая хромосома.

Все четыре хромосомы разделены на 102 секции. *X*-хромосома имеет 20 секций (от 1 до 20), вторая хромосома — 40 секций: 20 секций в *2L* плече (с 21-й по 40-ю) и 20 секций в *2R* плече (с 41-й по 60-ю). Третья хромосома имеет также 40 секций: 20 секций в *3L* (с 61-й по 80-ю) и 20 секций в *3R* (с 81-й по 100-ю). У четвертой хромосомы всего две секции: 101 и 102. Секции делят на более мелкие участки, в каждой секции по шесть участков. Обозначают участки буквами А, В, С, D, Е, F.

Такая система обозначения позволяет быстро ориентироваться в картах хромосом. Например, обозначение 83A1 указывает, что речь идет о первой полосе, находящейся в секции 83, подразделения А правого плеча третьей хромосомы.

Политенные хромосомы дрозофилы имеют следующую длину, мкм: X-хромосома — 220, вторая хромосома — 460, третья хромосома — 485, четвертая хромосома — 15. Общая длина 1180 мкм, в то время как длина метафазных хромосом из обычных соматических клеток составляет 7,5 мкм.

Подсчет хромосом

В классической цитологии хромосомы подсчитывали в метафазе митоза на постоянных препаратах поперечных микротомных срезов корней. Такие препараты окрашивали гематоксилином по Гейденгайну, чтобы получить контрастно видимые хромосомы. Сейчас хромосомы подсчитывают на давленных препаратах после специальной обработки корней или листочков перед фиксацией (см. с. 97).

Препарат рассматривают сначала при небольшом увеличении, а затем с объективом 40X. Вначале необходимо найти метафазные пластинки и отметить тушью с противоположной стороны препарата. Если у объекта крупные хромосомы и их немного, при увеличении в 400—600 раз их можно подсчитать. Для этого выбирают пластинки, где хромосомы лежат отдельно, не налегая друг на друга.

В тех случаях, когда объект имеет большое число хромосом, работать необходимо с иммерсионным объективом, имеющим числовую апертуру 1,3 или 1,4. Для этого на фронтальную линзу объектива и на конденсор под препарат наносят по капле кедрового масла.

Каждую хромосому рассматривают, пользуясь микрометрическим винтом, чтобы лучше видеть ее очертания. На бумагу наносят их контуры. Хромосомы обязательно нумеруют по порядку зарисовки. Последняя цифра укажет на общее число хромосом. Чтобы получить достоверные результаты, нужно подсчитать число хромосом не менее чем в 10 различных клетках. В ряде случаев для подсчета приходится пользоваться окуляром с сеткой и рассматривать в нем каждый квадрат, чтобы не пропустить ни одной хромосомы.

Для более точной передачи формы и размера важно зарисовывать хромосомы с препарата. Если зарисовку ведут с микротомных препаратов, то необходимо подобрать пластинку с хромосомами, не поврежденную ножом во время резки на микротоме. Для этого ее проверяют на фокус при различной глубине. Вначале должен быть виден тонкий слой цитоплазмы. Вращением микрометрического винта получают изображение хромо-

сом. При дальнейшем вращении винта теряется контур хромосом и снова виден слой цитоплазмы.

Для зарисовки выбирают пластинки, на которых хромосомы рассредоточены. Контур хромосом наносят на бумагу и неоднократно сверяют с реальной формой хромосом на препарате.

Исследование кариотипов имеет большое значение в систематике, при установлении взаимоотношений изучаемого вида с другими, т. е. эволюции этого вида. Изучая морфологию хромосом, можно распознать хромосомные комплексы одних видов в составе других, более сложных полиплоидных наборов. Подмечено, что виды, имеющие одинаковое число хромосом, отличаются по их величине и морфологии. В селекции растений нередко приходится устанавливать число хромосом при выявлении полиплоидов, скрещивании различных видов, изучении новых форм, воздействии радиацией, химическими мутагенами и т. д.

После знакомства на препаратах с кариотипами различных видов зарисовывают и подсчитывают хромосомы у отдельных видов. Результаты подсчета числа хромосом в метафазе митоза записывают в таблицу:

Название рода и вида растений	Номер метафазной пластинки	Число хромосом

Идентификация хромосом

Морфометрический метод. Важнейшие показатели, которыми пользуются при идентификации хромосом, следующие:

абсолютная длина хромосомы (L^a), мкм;

относительная длина хромосомы (L^r) =

$$= \frac{\text{длина хромосомы}}{\text{длина всех хромосом ядра}}, \quad \%;$$

плечевой индекс (I^b) = $\frac{\text{длина длинного плеча хромосомы}}{\text{длина короткого плеча хромосомы}};$

центромерный индекс (I^c) =

$$= \frac{\text{длина короткого плеча хромосомы}}{\text{длина всей хромосомы}}, \quad \%;$$

индекс спирализации (I^s) =

$$= \frac{\text{суммарная длина двух коротких хромосом}}{\text{суммарная длина двух длинных хромосом}}, \quad \%.$$

Показатель I^s применяют для оценки степени конденсации хромосом при отборе метафазных пластинок. Степень конденсации хромосом в разных клетках оценивают и по общей длине хромосом набора. Замечено, что крупные хромосомы укорачиваются больше, чем мелкие.

Для идентификации хромосом лука (*Allium cepa*) проводят следующую работу. Проростки семян с корнями длиной 10—15 мм помещают на 2 ч в 0,025%-й раствор колхицина при 22°C, а затем на 2 ч в насыщенный раствор 8-оксихинолина при 10°C, фиксируют в уксусном спирте и окрашивают по Фельгену. При отборе пластинок с хромосомами необходимо следить, чтобы степень конденсации хромосом варьировала в узком интервале, хромосомы не налегали друг на друга, разделение на хроматиды было четким.

Морфометрический метод нередко сочетают с составлением поликариограмм. Для этого строят график. На оси абсцисс откладывают центромерный индекс, на оси ординат — относительную длину хромосомы. На графике выявляется положение хромосом относительно друг друга в общем наборе.

Следует отметить, что при описании кариотипов и характеристике отдельных хромосом не всегда используют одинаковую терминологию и обозначения. Приведем обозначения, которые применяют во Всесоюзном научно-исследовательском институте растениеводства (Л. И. Абрамова; 1965, 1971).

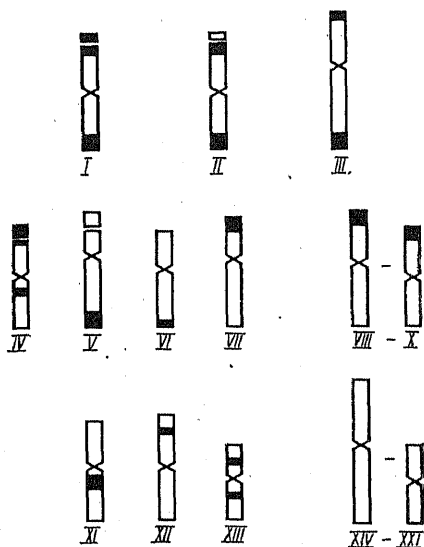
Длинные хромосомы (см. рис. 57) обозначаются буквой *L* (англ. long — длинный), средние — *M*, короткие — *S*. Характеристика хромосом по морфологии основана на положении центромеры. При среднем положении центромеры у метацентрических хромосом говорят о медианной центромере (*m*); у субметацентрических хромосом центромера субмедианная (*s*); положение центромеры у акроцентрических хромосом сдвинуто к одному из коротких плеч и обозначается буквой *a*.

Характеристику хромосом записывают в виде заглавной буквы, обозначающей ее размер, и малой буквы, расположенной ниже строки, отмечающей положение центромеры. Наличие вторичной перетяжки (*c*) и спутника (*t*) указывают в виде индекса заглавной буквы выше строки. Цифры перед заглавной буквой указывают на число пар сходных хромосом в гаплоидном наборе хромосом. Прежде чем составить запись (см. рис. 57), надо изучить формулу кариотипа на примере купены *Polygonatum humile* ($2n=20$):

$$1L_m + 1M_m^c + 3M_s + 1M_a + 1S_m + 2S_s + 1S_a.$$

Методика дифференциального окрашивания хромосом. Различные участки хромосом, имея неодинаковую степень конденсации, приобретают способность связываться с основными красителями так, что появляется поперечная ис-

Рис. 62. Идиограмма дифференциально окрашенных хромосом пырея сизого (*Agropyron glaucum*): I—XXI—номера хромосом. По Т. А. Потаповой, А. И. Шаповой.



черченность хромосом. Это используют для идентификации хромосом. Различают шесть типов полос в зависимости от техники окрашивания: Q, C, R, G, T, N. Наиболее эффективен для растений C-метод, позволяющий выявить гетерохроматиновые участки по длине хромосомы (рис. 62). Ниже приведено приготовление препаратов по C-методу, начиная с предобработки и фиксации материала, его осуществляют по методике, применяемой во ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии ВАСХНИЛ. Порядок работы следующий.

1. Проращивание семян ржи, пшеницы, тритикале в чашках Петри при 24 °С до образования корней длиной 1—2,5 см.
2. Предобработка корней (вместе с семенами) в 0,2%-м растворе колхицина (можно добавить α -монобромнафталин) в течение 2 ч.
3. Промывание корней в ледяной воде 1—2 ч.
4. Подсушивание корней фильтровальной бумагой и фиксация их в 45%-м растворе уксусной кислоты. Корни оставляют на ночь в холодильнике.
5. Промывание корней в воде и гидролиз в 0,2 н. HCl 5 мин при 60 °С на водяной бане.
6. Промывание корней в воде.
7. Мацерация отрезанных кончиков корней в 1—2%-м растворе ферментов (пектиназа, цитаза или целлюлаза) с участием ацетатного буфера при pH 4,8 в течение ночи. В зависимости от объекта смешивают несколько капель буфера и фермента (одно из возможных соотношений 12:2).

Приготовление ацетатного буфера. 27,2 г ацетата натрия растворить в 1 л воды (1) и отдельно 11,2 мл ледяной уксусной кислоты растворить в 1 л воды (2). Взять 60 мл раствора 1 и 40 мл раствора 2 для получения буфера с pH 4,8.

8. Приготовление из мацерированных кончиков корней суспензии клеток путем тщательного перемешивания их в пробирке и центрифугирование ее.

9. Промывание осадка водой и повторное центрифугирование.
10. Добавление к осадку 45%-го раствора уксусной кислоты и приготовление давленого препарата из суспензии клеток.
11. Просмотр препарата под микроскопом с фазово-контрастным устройством.
12. Перенос препарата на сухой лед, отделение покровного стекла, обезвоживание в спиртах от 60 до 100%-й концентрации и подсушивание теплым воздухом.
13. Обработка сухих препаратов перед окрашиванием насыщенным раствором гидроксида бария $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 6—8 мин.
14. Промывание препаратов в 1 н. HCl , затем дистиллированной водой.
15. Выдерживание подсушенных препаратов в растворе, условно обозначенном 2SSC, при 60°C в течение часа.
- Приготовление 2SSC. 17,55 г NaCl и 10,7 цитрата натрия ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 5,5\text{H}_2\text{O}$) довести водой до 1 л (рН 7).
16. Промывание препаратов в дистиллированной воде и сушка в течение 15 мин при 60°C в термостате.
17. Выдерживание сухих препаратов в растворе красителя в концентрации 1:15 азур-эозина по Романовскому на фосфатном буфере при рН 6,8 в течение 20 мин (время устанавливают в зависимости от объекта путем контроля под микроскопом).
- Приготовление фосфатного буфера. $\frac{1}{15}$ М $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (9,46 г доводят водой до 1 л) и $\frac{1}{15}$ М KH_2PO_4 (9,1 г доводят водой до 1 л). Затем смешивают по 50 мл каждого раствора для получения буфера рН 6,8.
18. Промывание препаратов в дистиллированной воде несколько раз и высушивание их.
19. Помещение препаратов в ксилол и заключение в канадский бальзам.

В приведенной методике мацерация корней осуществляется с использованием ферментов и ацетатного буфера. Препарат готовят из суспензии клеток после центрифугирования. При одной из модификаций этого метода в качестве фиксатора используют уксусный алкоголь (3:1). Для мацерации тканей берут 45%-й раствор уксусной кислоты при слабом нагревании с последующим окрашиванием корней ацетокармином или азур-эозином. После приготовления давленого препарата его помещают на сухой лед, удаляют покровное стекло, обезвоживают в серии растворов спирта или в 96%-м его растворе. Сушат на воздухе не менее суток или 1 ч в термостате при 60°C и обрабатывают 3,5%-м раствором гидроксида бария 12 мин.

Методика исследования полового хроматина

Половой хроматин (тельце Барра) легко обнаруживается в ядрах клеток слизистой полости рта у женщин. По современным представлениям, из двух X-хромосом половой хроматин обра-

зует только одна, находящаяся в неактивном состоянии. Число ядер, содержащих половой хроматин, составляет у женщин 40% (с колебанием от 20 до 71%), у мужчин — 0—0,3%. Таким образом, половой хроматин выявляется у женщин и редко у мужчин. При отклонении от нормы по числу X-хромосом половой хроматин можно обнаружить у мужчин при синдроме Клайнфельтера (соматическое число хромосом 47, из них половых хромосом три: ХХУ).

У женщин с синдромом Шерешевского—Тернера (соматическое число хромосом 45, из них одна половина X-хромосома) половой хроматин не выявляется.

Для приготовления давленных препаратов необходимо взять шпателем соскоб из полости рта и сделать мазок на предметном стекле. Мазок окрашивают в ацетоорсеине и через пять минут препарат просматривают под микроскопом. Отыскивают интерфазные ядра. Тельца полового хроматина имеют неодинаковую форму и обычно хорошо видны на фоне мелкозернистой нуклеоплазмы (рис. 63).

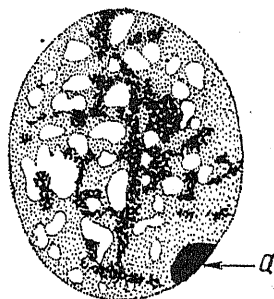


Рис. 63. Интерфазное ядро, содержащее половой хроматин (a).

Методы приготовления давленных препаратов для изучения хромосом с учетом особенностей сельскохозяйственных культур

Пшеница. В работе с пшеницей (особенно мягкой) наиболее интересны исследования по использованию анеуплоидии для генетического анализа, получению межсортовых замещенных линий (например, линий, у которых одна пара хромосом замещена парой хромосом другого сорта), созданию линий путем добавления хромосом одного вида или рода к хромосомному набору пшеницы. Для решения подобных задач и выявления анеуплоидов необходим точный цитологический анализ.

Ниже приведена методика приготовления препаратов для изучения соматических хромосом пшеницы, предложенная в 1958 г. Райли и другими исследователями. С учетом некоторых дополнений она выглядит так.

Семена замачивают в дистиллированной воде и ставят в чашках Петри на сутки в термостат при температуре 25—26 °С, затем сливают воду и на день семена помещают в холодильник при 3—4 °С, а на ночь снова в термостат при 25—26 °С. Переменный режим обеспечивает быстрое отрастание корней длиной 1—1,5 см с максимальным числом клеток, находящихся в метафазе.

Отрезанные корни (до 10 мм) помещают в насыщенный раствор α -бромнафталина на 5 ч при комнатной температуре (или на сутки в холодильник). Фиксацию осуществляют в ледяной уксусной кислоте не менее 30 мин. За фиксацией следует гидролиз в нормальной соляной кислоте при 60°C в течение 12 мин и окрашивание реактивом Шиффа 1—2 ч. После этого корни помещают на предметное стекло, отрезают кончики, добавляют каплю 45%-го раствора уксусной кислоты, накрывают покровным стеклом и раздавливают объект так, чтобы клетки корня распределились в один слой (см. рис. 59).

Рожь. Семена проращивают в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге при температуре 23—25°C в течение 35—40 ч в темноте. Для активации деления и получения максимума метафазных пластинок наклюнувшиеся семена сначала переносят в холодильник или в снег на 3—4 дня при температуре от нуля до -4°C, а затем ставят в термостат на ночь при 24—26°C. Проросшие зерновки с корнями помещают до фиксации в смесь, состоящую из 0,2%-го раствора колхицина и насыщенного раствора α -бромнафталина (его добавляют по одной капле на 10 мл раствора колхицина) на 2 ч.

После предобработки кончики корней величиной 1—1,5 см обрезают и фиксируют в уксусном спирте (3:1) до суток. После фиксации материал промывают в 70%-м растворе спирта, мацерируют в 10%-м растворе соляной кислоты 8 мин и помещают в 2%-й раствор ацетокармина для окрашивания при слабом нагревании красителя. Хорошие результаты также дает окрашивание в реактиве Шиффа в течение 2 ч с предварительным гидролизом в 1 н. HCl при 60°C 5—8 мин. Кончик корня с зоной деления раздавливают на предметном стекле в капле 45%-го раствора уксусной кислоты.

Эту методику использовали в Московской сельскохозяйственной академии имени К. А. Тимирязева (ТСХА) для подсчета и анализа хромосом у диплоидной и тетраплоидной ржи, а также для выявления анеуплоидов.

Гречиха. Корни фиксируют в уксусном спирте, промывают в двух сменах 96%-го раствора этилового спирта по 30 мин и оставляют на хранение в 70%-м его растворе в холодильнике при 3—4°C.

Из 70%-го раствора этилового спирта материал переносят в 3%-й раствор перекиси водорода на 30 мин, а затем в ацеторсеин, содержащий соляную кислоту, на 6—8 суток при температуре 3—4°C.

Замечено, что для окрашивания корней тетраплоидов требуется больше времени, чем диплоидов.

Окрашенные кончики корней с зоной деления около 1 мм после отделения и удаления остальной части корня раздавливают на предметном стекле в свежей капле ацеторсеина.

Приготовление красителя. К 2 г орсеина добавляют 50 мл ледяной уксусной кислоты и оставляют на ночь. Утром нагревают до кипения. К остывшему раствору приливают 50 мл дистиллированной воды и снова нагревают до кипения. Через сутки краситель фильтруют и добавляют к нему нормальную соляную кислоту в соотношении 9:1. Рекомендуется фильтровать краситель перед каждым употреблением.

Метод позволяет не только проводить подсчет хромосом, но и изучать их перестройки (Ткачева, Довженко, 1968).

Для приготовления временных препаратов можно использовать в качестве красителя ацетолакмоид. По методике Соболева и Адамчук, берут 4 г лакмоида, растворяют в 200 мл 45%-го раствора уксусной кислоты при кипячении с обратным холодильником. Корни выдерживают в красителе 2—3 суток при комнатной температуре. Мацерация происходит при кипячении объекта в растворе ацетолакмоида. После этого готовят обычный давленный препарат.

Картофель. Семена проращивают в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге, а клубни — в кристаллизаторах с опилками. До фиксации отрезанные корни обрабатывают водными растворами: колхицина 0,01%-й концентрации в течение 5 ч или 8-оксихинолина 0,02%-й концентрации на протяжении 2—2,5 ч. Промытые в 96%-м растворе спирта корни переносят в уксусный алкоголь (3:1) или фиксатор Батталья (5:5:1:1). Продолжительность фиксации от 1 до 6 ч в уксусном алкоголе и 5 мин в фиксаторе Батталья, но в последнем корни можно оставить на длительное хранение.

Из фиксатора корни переносят сначала на 10 мин в 1 н. раствор соляной кислоты для промывки, а затем для гидролиза помещают в 50%-й ее раствор на 2 ч, окрашивают объект реактивом Шиффа не менее 15 мин при комнатной температуре. Затем корни, промытые в 45%-м растворе уксусной кислоты, помещают на предметное стекло в каплю той же кислоты и удаляют у них неокрашенную часть. Оставшуюся на стекле зону деления корня разрезают на несколько частей, накрывают покровным стеклом и легким постукиванием заостренной спичкой добиваются равномерного распределения клеток в один слой. Метод можно использовать не только для подсчета хромосом, но и изучения их морфологии (см. рис. 57).

Сахарная свекла. В лаборатории генетики и цитологии Всесоюзного научно-исследовательского института сахарной свеклы для подсчета хромосом у сахарной свеклы фиксируют молодые, обычно этилированные, листочки длиной 3—4 мм в уксусном алкоголе в течение 1,5—2 ч. Затем промывают материал в воде и проводят мацерацию в смеси 96%-го раствора этилового спирта и концентрированной соляной кислоты (1:1) в течение 5—6 мин. После этого материал выдерживают для просветления в хлоралфеноле (10 г хлоралгидрата и 5 г

фенола растворяют в 100 мл воды) в течение 5 мин. Окрашивают листочки в ацетокармине, в котором материал находится до суток. Давленные препараты готовят обычным способом.

Для подсчета числа хромосом в корешках свеклы семена проращивают на влажной фильтровальной бумаге в чашках Коха при температуре 30°C в течение двух-трех суток. По достижении корнями длины 5—8 мм семена переносят в холодильник с температурой 4°C на 3 ч или на ночь. Корни длиной 8—13 мм фиксируют.

Порядок работы по методике ТСХА следующий.

1. Фиксация этилированных листочков длиной 2—4 мм в период, когда растение имеет 2—3 пары листьев. В качестве фиксатора используют уксусный алкоголь (3:1). Продолжительность фиксации 12—24 ч.

2. Промывание в 70%-м растворе этилового спирта два раза.

3. Окрашивание ацетокармином. Перед окраской на 10 см³ кармина необходимо добавить 1 см³ насыщенного раствора FeCl₂. В тигли с листочками наливают 0,5—0,7 мл кармина, нагревают до кипения, накрывают тигли пленкой и держат при 15—18°C. Затем листочки переносят в 1%-й раствор ацетоорсеина и слегка подогревают.

4. Приготовление давленного препарата в капле 40%-го хлоралгидрата.

Для морфометрического анализа хромосом клубочки свеклы замачивают в воде около 7 ч и проращивают в термостате при 28—30°C. Когда корни достигнут 1—1,5 см, клубочки помещают на сетку с водой и еще доращивают при той же температуре. Перед полуторачасовой обработкой парадихлорбензолом при 15°C корни разрезают лезвием вдоль на $\frac{1}{3}$ от основания. Перед фиксацией в уксусном алкоголе их промывают водой. Экспозиция при фиксации — двое суток при 35°C. Мацерацию осуществляют в 1 н. растворе HCl при 60°C 4 мин, затем промывают материал в воде и окрашивают в 2%-м растворе ацетоорсеина в течение суток.

Хлопчатник. Семена замачивают в касторовом масле на сутки, затем промывают и ставят в чашках Петри в термостат при температуре 29—30°C на проращивание. Кончики корней длиной 7—8 мм обсушивают фильтровальной бумагой и фиксируют в смеси Левитского (5 ч. 1%-го раствора хромовой кислоты и 5 ч. 10%-го раствора формалина) в течение 24 ч. Затем их 4 ч промывают в воде и обезвоживают в спирте.

Хранят объекты в 70%-м растворе спирта. Мацерируют их в 20%-м растворе NaOH, а затем окрашивают.

Приготовление красителя. Растворяют 4 г гематоксилина и 1 г железоаммонийных квасцов в 100 мл 45%-го раствора уксусной кислоты. Краситель ставят в теплое место для созревания на 7 сут.

Корни помещают в краситель и ставят в термостат при температуре 40°C. Окрашивание длится более 3 ч. Затем объект раздавливают на предметном стекле в смеси глицерина и концентрированного водного раствора хлоралгидрата (1:2).

Лук. Корни лука обрабатывают 0,2%-м раствором колхицина на протяжении 2 ч, фиксируют уксусным алкоголем, а затем гидролизуют в 1 н. растворе соляной кислоты при 60°C 7 мин и окрашивают реактивом Шиффа.

Томат. Для фиксации берут проростки семян с корнями длиной 6—8 мм. Предварительно обрабатывают их колхицином 0,005%-й концентрации в течение 1,5 ч. Фиксируют уксусным алкоголем, окрашивают ацетокармином.

Огурец. Для фиксации отбирают проросшие семена с корнями длиной 20—25 мм. Предварительно их обрабатывают насыщенным раствором α -бромнафталина в течение 1,5—2 ч на холоде, фиксируют уксусным алкоголем, окрашивают ацетокармином.

Капуста, редис. Семена проращивают при 25°C с использованием раствора Кнопа. Фиксируют материал при той же температуре в ледяной уксусной кислоте в течение суток. В фиксатор добавляют ацетоорсеин из расчета 5—10 капель на 10 мл ледяной уксусной кислоты. Используют 2%-й раствор ацетоорсеина, который готовят на 45%-й уксусной кислоте. Окрашивание в таком красителе длится двое суток. Объекты раздавливают в глицерине.

Плодовые культуры. Молодые корни, листочки, усы фиксируют в уксусном алкоголе 2—3 ч (до суток), промывают в 96%-м растворе спирта, протравливают 2—20 мин в 4%-м растворе железоммонийных квасцов, промывают в дистиллированной воде и помещают в ацетгематоксилиновый краситель, подогревая его два-три раза до закипания. Затем объект помещают на предметное стекло в каплю глицерина, подогревают, накрывают покровным стеклом и раздавливают.

Приготовление красителя. Растворяют 1 г гематоксилина в 50 мл дистиллированной воды, подогревая их на водяной бане. Раствор оставляют на свету при доступе воздуха в течение трех суток, а потом к нему приливают 50 мл уксусной кислоты. В дальнейшем краситель хранят в темной посуде. Перед употреблением в него добавляют несколько капель ацетата железа или помещают железный предмет на несколько секунд.

Метод применяют в работе с вишней, сливой, черешней, смородиной, виноградом, яблоней и грушей.

Для подготовки препаратов смородины, крыжовника, малины, земляники, яблони, винограда в Центральной генетической лаборатории имени И. В. Мичурина использовали следующую методику.

1. Фиксация корней или зачаточных листочков в уксусном алкоголе (3:1) 30 мин без предварительной обработки.

2. Обработка проб разведенной соляной кислотой (соотношение кислоты и воды 1:1).

3. Промывание в воде на предметном стекле. Излишки воды удаляют фильтровальной бумагой.

4. Окрашивание основным фуксином при подогревании. Для приготовления красителя 0,5 г фуксина растворяют в 100 мл кипящей воды.

5. Удаление избытка красителя 45%-м раствором уксусной кислоты с последующим промыванием в воде.

6. Приготовление давленного препарата в глицерине.

МУТАЦИИ

Методы выявления

Несмотря на то что хромосомы каждого кариотипа обладают постоянством числа, формы и внутренней структуры, они способны изменяться спонтанно или под влиянием различных агентов: ионизирующих излучений (рентгеновского, нейтронного и альфа-, бета-, гамма-излучений радиоактивных изотопов) и химических веществ.

Изменения в хромосомах, передающиеся потомству, принято называть *мутациями*. Этот термин впервые ввел де Фриз. Мутации вызывают изменение самых различных признаков у растений. Значение мутаций в эволюции и селекции растений как источника изменчивости считается общепризнанным. Поскольку спонтанные мутации возникают очень редко, селекционер стремится их индуцировать воздействием радиации и химических мутагенов.

Огромный вклад в развитие исследований по мутагенезу внесли отечественные ученые: по радиационному — Н. П. Дубинин, по химическому — И. А. Рапопорт. Первые доказательства влияния радиации на возникновение мутаций получили в СССР Г. А. Надсон и Г. С. Филиппов в 1925 г. и в США Г. Мёллер в 1927 г.

Изменения, возникающие в хромосомах, могут быть различными. По характеру преобразования генотипа различают *генные*, или *точковые*, мутации. Они представляют собой изменения отдельных участков хромосом на молекулярном уровне и невидимы в световой микроскоп. Другую группу составляют *перестройки хромосом* (структурные мутации), которые можно изучать под микроскопом. Их возникновение связано с фрагментацией и рекомбинацией хромосом (рис. 64). В третью группу входят *геномные* мутации. Они связаны с изменением числа геномов (полиплоидия) или хромосом (анеуплоидия).

При изучении природы возникших изменений в генотипе используют одновременно цитологические и генетические тесты:

анализ митоза и мейоза;
анализ пыльцевых зерен на фер-
тильность;

подсчет числа хромосом;
наблюдения за расщеплением
в мутантных линиях;

скрещивание мутантов с исход-
ной линией и наблюдение за ре-
зультатами расщепления гибридов.

Цитологический анализ митоза осуществляют сразу после обработ-
ки семян мутагенами. Подсчет чис-
ла хромосом облегчает выявление
анеуплоидов и полиплоидов. Если
необходимо отличить точковые
мутации от перестроек хромосом,
из цитологических тестов наиболее
подходит анализ пыльцы и мейоза.
Отсутствие стерильной
пыльцы у мутанта указывает на точковую мутацию. При изу-
чении мейоза у такого мутанта обращают внимание на харак-
тер образования бивалентов в диакинезе и метафазе I. Так,
у мягкой пшеницы образуется 21 бивалент в мейозе, и если все
биваленты закрытого типа, предположение о точковой мутации
верно.

Для растений-мутантов, у которых наблюдаются пере-
стройки хромосом, характерен определенный процент стериль-
ной пыльцы. В мейозе в таких случаях возможны следующие
нарушения: гетероморфные биваленты, если конъюгирующие
хромосомы имеют разную длину; кольца из нескольких хромо-
сом; ослабление конъюгации хромосом и снижение числа
хиазм (у мягкой пшеницы в этом случае возрастает число бива-
лентов открытого типа); мосты и фрагменты в анафазе.
У анеуплоидов в мейозе обнаруживаются униваленты.

Типы перестроек

Под термином *перестройки*, или *абберрации*, хромосом обычно
понимают изменения их структуры, вызванные перекомбина-
цией различных участков одной или разных хромосом под
влиянием мутагенов.

В отличие от точковых мутаций перестройки хромосом от-
носятся к *структурным* мутациям. Перестройки могут быть спон-
танными и индуцированными. Поскольку такие мутации затра-
гивают значительные участки хромосом, они изменяют их мор-
фологию, что удается обнаружить под микроскопом. При ана-
лизе перестроек исходят из того, что хромосома на протяжении
клеточного цикла может быть дихроматидной (период G_2 ,

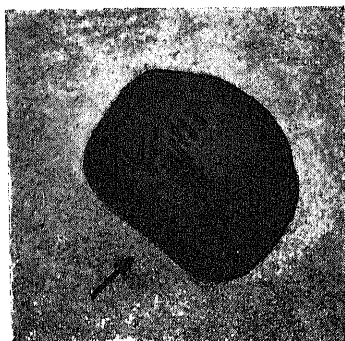


Рис. 64. Клетка из конуса на-
растания корня ячменя в ана-
фазе митоза после облучения
гамма-лучами (виден мост).

профаза, метафаза) и монохроматидной (период G_1 , анафаза, телофаза). В зависимости от состояния хромосомы возникают различные типы перестроек: *хроматидные*, когда хромосома удвоена, или *хромосомные*, когда она не удвоена. При повреждении хромосом в S-периоде возможны одновременно хромосомные и хроматидные перестройки. Конфигурации хромосомных и хроматидных перестроек отличаются друг от друга тем, что первые в митозе всегда удвоены.

По поводу механизма образования перестроек ученые строят различные предположения. Стадлер выдвинул гипотезу «первичного разрыва», согласно которой разрывы хромосом предшествуют образованию перестроек. Разорванные концы хромосом или воссоединяются в первоначальном варианте, или перекомбинируются, или остаются несоединенными.

Сакс создал теорию возникновения перестроек хромосом, которая согласуется с гипотезой Стадлера. Он объяснил возникновение одноударных и двуударных перестроек и выдвинул предположение, что разорванные хромосомы способны к соединению в течение ограниченного периода. Развивая эту теорию, Ли и другие ученые допускают, что перестройка возникает в том случае, когда разорванные концы хромосом находятся на малом расстоянии друг от друга.

Н. П. Дубинин выдвинул концепцию, согласно которой образование перестроек хромосом идет в несколько этапов: вначале происходит возбуждение хромосомы и образование потенциального изменения, затем наступает репарация этих изменений, во время которой и появляются аберрации. Репарация осуществляется ферментами, которые «разрезают и соединяют» хромосомную нить. На третьем этапе возникшее изменение приобретает необратимое состояние.

Типы выявляемых перестроек хромосом. Кроме хромосомных и хроматидных, выделяют также внутрихромосомные и межхромосомные типы перестроек, а в зависимости от обмена участками — симметричные и асимметричные, простые и сложные. Поскольку перестройки изменяют генный состав хромосом, то, с этой точки зрения, все нарушения принято делить на делеции, дупликации, инверсии и транслокации. Первые три типа изменений относятся к внутрихромосомным, последний — к межхромосомным.

На рисунке 65 приведены перестройки хромосом скерды зеленой в метафазе митоза.

Делеции, или потери участка хромосомы, могут быть хромосомные и хроматидные, концевые, когда теряется теломера, и интерстициальные, если выпадает внутренний участок.

Интерстициальные делеции сопровождаются появлением колец или незамкнутых фрагментов, концевые — парными фрагментами, если они хромосомного происхождения, и оди-

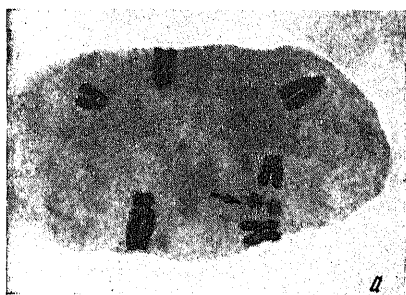


Рис. 65. Хромосомные aberrации хромосом в метафазе митоза у скерды зеленой:

А — бесцентромерные кольца; Б — хромосомная асимметричная транслокация между гомологами хромосомы А в длинных плечах; В — изохроматидная делеция в длинном плече у хромосомы А. По Л. С. Немцевой.

ночными, если они хроматидные. Размеры фрагментов сильно варьируют.

Если одна хроматида удлиняется за счет встраивания участка другой, сестринской, следовательно, произошла *дупликация*.

Инверсия возникает в результате двух повреждений в хромосоме или хроматиде, когда внутренний участок переворачивается на 180° . При этом нарушается порядок расположения генов, но генный материал полностью сохраняется. Различают *парацентрические* (переворачивается ацентрический участок плеча) и *periцентрические* (переворачивается участок с центромерой) инверсии. Первые трудно обнаружить, вторые выявляются лишь при сдвиге центромерного участка.

Транслокации относятся к межхромосомным обменам. При этом происходит перемещение участка одной хромосомы в другую. Транслокации могут быть и хроматидные, когда обмен участками происходит между хроматидами разных хромосом.

Различают *симметричные* транслокации, если переносятся ацентрические участки, и *асимметричные*, если речь идет о перемещении центромерных участков. В последнем случае ацентрические участки обычно теряются, а образующиеся дицентрики легко распознать.

Нередко в результате межхромосомных обменов возникают *триады* — трехлучевые конфигурации хромосом. Чтобы

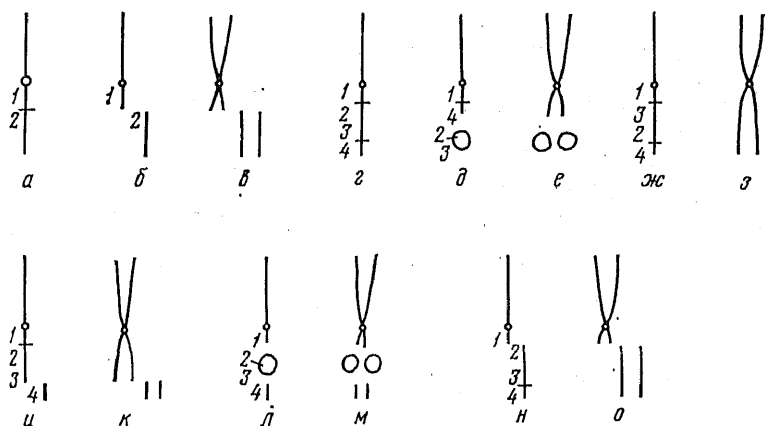


Рис. 66. Схема, иллюстрирующая образование хромосомных перестроек при одном (а—в) и двух повреждениях хромосомы в одном плече (з—о):

а — хромосома с одним поврежденным локусом, 1, 2 — поверхности разрыва; б — укороченная хромосома и фрагмент при отсутствии воссоединения; в — та же укороченная хромосома и парный ацентрический фрагмент после удвоения; г — хромосома с двумя поврежденными локусами в одном плече, 1—4 — поверхности разрыва; д — укороченная хромосома после соединения двух участков (1, 4) и выпавший участок (2, 3), образовавший кольцо; е — то же, после удвоения; ж — хромосома с парацентрической инверсией после переворота участка 2—3 на 180° и соединения; з — то же, после удвоения; и — укороченная хромосома после соединения поверхностей разрывов 1—2 и фрагмент (4); к — то же, после удвоения; л — укороченная хромосома, кольцо и фрагмент при отсутствии соединения 1, 2 и 3, 4; м — то же, после удвоения; н — укороченная хромосома и крупный ацентрический фрагмент (2, 3, 4), образовавшийся после соединения разрывов 3—4 (то же самое можно было бы наблюдать, если бы участок 2—3 перевернулся на 180° и присоединился к фрагменту с поверхностью разрыва 4); о — то же, после удвоения.

появились такие фигуры, должны быть повреждены три локуса в двух хромосомах: изохроматидный разрыв в одной хромосоме и хроматидный в другой. Такой тип нарушений также относят к транслокациям.

Хромосомные перестройки. Представим себе хромосому в G_1 -периоде, в интерфазе, когда она еще не удвоена (рис. 66). Пусть в этот период хромосома оказалась поврежденной в одном локусе. Возникают две поверхности разрыва и два участка хромосомы (один с центромерой, другой ацентрический, т. е. без центромеры). Каждый участок хромосомы несет на одном конце теломеру, не способную к соединениям, а на другом конце — поверхность разрыва, способную к соединению только с разорванным концом. В этом случае никаких условий для рекомбинации участков в хромосоме нет. Возможны лишь два исхода: воссоединение участков с образованием прежней хромосомы или отсутствие воссоединения и образование укороченной хромосомы и ацентрического участка в незамкнутом состоянии. В последнем случае после удвоения можно наблюдать в метафазе митоза дихроматидную укорочен-

ную хромосому и парный ацентрический фрагмент. В анафазе хроматиды расходятся к полюсам, а фрагмент обнаруживается между полюсами.

Чтобы представить ситуацию, при которой возможна перекомбинация участков хромосомы, необходимо иметь в хромосоме хотя бы два повреждения в разных локусах.

Если оба поврежденных локуса находятся в одном плече хромосомы, возникают четыре поверхности разрыва и три участка, способные к перекомбинации. Возможно несколько исходов при условии, что не произошло воссоединения хромосомы. Проследим за каждым участком.

Внутренний ацентрический участок с двумя поверхностями разрыва может выпасть. При этом или его концы соединяются друг с другом, образуя бесцентромерное кольцо, или без соединения возникает ацентрический фрагмент. Кольцо или фрагмент удваивается. Если тот же участок не выпадает из хромосомы, а только переворачивается на 180° , то образуется парацентрическая инверсия, которая не затрагивает участка, несущего центромеру, и под микроскопом в митозе не обнаруживается.

Оба оставшихся участка — один с центромерой, другой без нее — имеют по одной поверхности разрыва и по одной теломере. Они могут соединиться между собой и дать укороченную хромосому. Если соединения не происходит, каждый из них удваивается. Тогда в митозе обнаруживаются две резко укороченные дихроматидные хромосомы и парный ацентрический фрагмент. Кроме того, каждый из двух последних участков хромосомы может соединиться с внутренним участком, о котором речь шла выше. Таким образом, в митозе можно наблюдать неодинаковые результаты после повреждения хромосомы в двух локусах одного плеча в зависимости от того, какие соединения осуществились.

Представим теперь случай, когда хромосома имеет два поврежденных локуса, расположенных в разных плечах, т. е. по обе стороны центромеры. В данной ситуации внутренний участок может выпасть и образовать кольцевую хромосому с центромерой, если произойдет соединение двух его концов. При несоединении концов образуется укороченная одновременно в двух плечах хромосома. Возможен и переворот внутреннего участка на 180° без выпадения, что даст перичентрическую инверсию, включающую центромеру. Такую инверсию визуально можно распознать в митозе в том случае, когда у хромосомы оказывается смещенной центромера и изменена длина плеч. Два других участка, имеющих теломеры, могут соединиться друг с другом и дать в митозе парный ацентрический фрагмент. Если оба участка остаются несоединенными, то каждый из них образует впоследствии парный ацентрический фрагмент.

Однако любой из этих двух участков может соединиться и с внутренним.

Итак, в зависимости от того, как расположены в хромосоме два поврежденных локуса (в одном плече или в разных), можно ожидать в митозе неодинаковые конфигурации перестроек.

Попытаемся теперь представить, какие перекомбинации участков хромосом могут возникнуть, если одновременно повреждены две хромосомы и в каждой из них по одному локусу. Если не произошло восстановления хромосом, возможны следующие исходы.

У хромосом появляются четыре конца, способных к соединению, и четыре участка (два с центромерами) и два ацентрические) — каждый с теломерой. Возможна симметричная транслокация, т. е. ацентрический участок плеча одной хромосомы перемещается на центромерный участок плеча другой хромосомы. Эта межхромосомная транслокация выявляется в том случае, если перестройка сопровождается изменением длины плеч хромосом. Когда центромерный участок одной хромосомы соединяется с центромерным участком другой, происходит асимметричная транслокация и образуется хромосома — дицентрик. Соединение двух оставшихся ацентрических участков дает фрагмент. Подобные обмены легко обнаружить в митозе.

Рассмотренные изменения в хромосомах можно наблюдать на препаратах, выявляя в метафазе митоза после удвоения изменения длины плеч, дицентрики, кольца, фрагменты.

Хроматидные перестройки. Этот тип перестроек образуется в период, когда хромосома удвоена, т. е. дихроматидна. Если поврежден один локус в одной из хроматид, то при отсутствии воссоединения эта хроматида укорачивается и образуется одиночный ацентрический фрагмент. Вторая хроматида остается нормальной. В анафазе можно ожидать, что расходящиеся хроматиды одной хромосомы будут неодинаковы по длине.

Если в одной дихроматидной хромосоме имеются два повреждения, возможно несколько вариантов. Оба повреждения могут находиться в разных хроматидах, и они *изолюкусные*, т. е. повреждены одинаковые локусы. Оба повреждения могут быть расположены в разных хроматидах, но они *неизолюкусные*. И, наконец, оба повреждения находятся в одной хроматиде. Проанализируем каждый из этих вариантов.

При изолюкусном повреждении хроматид образуются четыре участка. Каждый из них несет поверхность разрыва и теломеру. Здесь возможен обмен участками плеч, как симметричный, так и асимметричный. Первый из них не обнаруживается. При втором концы двух центрических хроматид соединяются. Ацентрические участки или остаются несоединенными, или,

соединяясь, дают кольцевой фрагмент. Если центрические участки не соединяются между собой, то образуются две укороченные хроматиды.

При неизолокусном повреждении также возможен симметричный и асимметричный обмен, при симметричном — образуются хроматиды, отличающиеся друг от друга по длине в отличие от изолокусного повреждения.

При локализации двух повреждений в одной хроматиде возникают три участка с поверхностями разрыва; при этом два из них несут по теломере и одному разрыву, а внутренний имеет две поверхности разрыва. Выпадение внутреннего участка приводит к интерстициальной делеции, при которой концы образовавшегося фрагмента, замыкаясь, образуют ацентрическое кольцо. Оставшиеся два участка (центрический и ацентрический) соединяются между собой, формируя укороченную хроматиду. Нормальная же хроматида изгибается против выпавшего участка поврежденной хроматиды, и по ее форме можно обнаружить поврежденный локус. Внутренний участок может не выпадать, а только перевернуться на 180° , что приведет к образованию инверсии. Несоединение каких-либо участков может несколько изменить наблюдаемую картину.

Разберем последствия обменов между хроматидами разных хромосом, допустив, что в одной из хроматид каждой хромосомы имеется по одному повреждению. При этом исключаем возможность нормального воссоединения участков, хотя оно и возможно.

Представим себе две хромосомы, состоящие из двух хроматид каждая. Обе хромосомы расположены рядом, так что отчетливо видны четыре хроматиды. В двух соседних хроматидах, принадлежащих разным хромосомам, произошло по одному повреждению. При симметричном обмене участками плеч, не содержащими центромер, возникает Х-образная фигура. Это произошла хроматидная транслокация. При асимметричном обмене образуются хроматида-дицентрик и одиночный фрагмент. Если какое-либо соединение не произойдет, результаты будут иные. Например, при отсутствии одного из возможных симметричных обменов появляются хроматиды с измененной длиной, т. е. наблюдается укорочение одной и удлинение другой хроматиды и, кроме того, образуется одиночный фрагмент.

Для обозначения соединения и несоединения проксимальных и дистальных концов в случае изохроматидных aberrаций приняты условные обозначения. Если произошло соединение проксимального конца одной и дистального конца другой хроматиды, такую aberrацию обозначают условно *Upd* (*U* — от англ. union — соединение; *p* — от proximus — проксимальный; *d* — от distalis — дистальный, т. е. юнион—проксимальный—дистальный). Соединение только проксимальных концов и несо-

единение дистальных концов обменивающихся участков обозначают $UpNd$ (N — от англ. *no* — нет, т. е. юнион—проксимальный—нон—юнион—дистальный). Полное отсутствие соединения обозначают $NUpd$, т. е. нон—юнион—проксимальный—дистальный. Рядом с таким символом записывают обозначение хромосомы.

После рассмотрения наиболее простых ситуаций при повреждении локусов хромосом становится ясно, что обнаружить под микроскопом обмены участками можно только тогда, когда изменяется морфология хромосом. Симметричные обмены не всегда можно выявить, так как после них обычно нормально протекает расхождение хромосом в митозе и не наблюдаются потери отдельных участков. Асимметричные обмены сопровождаются образованием дицентриков, колец, и их легко заметить под микроскопом. В митозе в таких случаях видны разрывы дицентрических хромосом при расхождении к полюсам. Ацентрические кольца и фрагменты обычно теряются.

Хромосомный мутагенез и методы изучения перестроек хромосом

При изучении перестроек хромосом необходимо учитывать типы хромосомного мутагенеза:

S-независимый (незадержанный), при котором абберации можно наблюдать в первых митозах, например после воздействия радиации. Повреждения хромосом в период G_1 или G_2 клеточного цикла дают в первых митозах соответственно хромосомные или хроматидные перестройки;

S-зависимый — если абберации выявляются не в первых митозах, а позднее, когда поврежденные хромосомы пройдут период репликации, например после обработки химическими мутагенами из группы алкилирующих соединений в период G_2 ;

ингибиторный, при котором подавлен синтез ДНК, нарушен механизм репликации и возможна фрагментация хромосом.

Хромосомные перестройки обычно изучают в анафазе или метафазе митоза. Метафазный метод считается более точным, он удобен для изучения тех объектов, которые имеют хромосомы, четко отличающиеся друг от друга по морфологии, например, как у скерды зеленой. Однако у многих сельскохозяйственных культур распознавать хромосомы по форме и величине в метафазе трудно, поэтому чаще применяют более простой анафазный метод. Остановимся подробнее на исследовании облученного материала.

Один из методов изучения последствий радиации — анализ различных изменений в первых митозах корней проросших семян. Первые митозы наблюдаются в корнях определенной длины, что устанавливают путем просмотра препаратов из кор-

ней различной длины. Вторые митозы отличаются от первых наличием микроядер в клетках.

В качестве объекта можно использовать лук-батун, у которого подробно изучены первые митозы после радиации. Берут корни длиной 5 мм через 50 ч после замачивания семян при температуре 24°C, фиксируют уксусным алкоголем на холоде. Для окраски корни помещают в ацетокармин и готовят давленные препараты, на которых просматривают нормальный митоз, учитывают спонтанные перестройки хромосом и определяют митотическую активность, т. е. отношение числа делящихся клеток к общему их числу.

Чтобы наблюдать действие радиации на митоз, проросшие семена с корнями длиной 5 мм облучают и через 20 ч после этого фиксируют с учетом длительности клеточного цикла. На давленных препаратах устанавливают также митотическую активность для сравнения с контролем.

Путем анафазного метода исследования определяют процент измененных анафаз (отношение числа измененных анафаз с мостами и фрагментами к общему их числу). Для анализа различных типов перестроек можно воспользоваться рисунками 64, 67, 68.

Метафазный метод исследования. При метафазном методе изучения хромосомных нарушений корни перед фиксацией необходимо обработать водным раствором колхицина определенной концентрации. Облучать можно сухие и проросшие семена, но при этом наблюдаются неодинаковые типы перестроек, так как клетки зародышей могут быть на различных этапах митотического цикла.

У пшеницы, гороха и бобов клетки зародыша в сухих семенах находятся в разных периодах интерфазы, поэтому после облучения уже в первых митозах корней обнаруживают хромосомные и хроматидные перестройки. В отличие от этих культур у скерды зеленой при облучении сухих семян наблюдаются перестройки только хромосомного типа. Следовательно, клетки зародыша у нее находятся в периоде G_1 .

Последовательность обработки проросших семян скерды зеленой для метафазного метода исследования следующая.

1. Замачивают семена в воде в течение одних-полутора суток при 25°C.

2. Проростки с корнями длиной 1,5—2,5 мм облучают дозой 300—500 Р* (на влажной бумаге) и оставляют расти в чашках Петри.

3. За 2 ч до фиксации проростки помещают в 0,01%-й раствор колхицина.

* 1 Р (рентген) = $2,58 \cdot 10^{-4}$ Кл/кг.

	Интерфаза	Метафаза	Анафаза	
Обин разрыб				Концевая делеция
				Интерстициальная делеция
Два разрыба				Кольцевая делеция
				Двухцентровая делеция
				Взаимная транслокация

Рис. 67. Основные категории хромосомных перестроек. По Н. П. Дубинину.

	Поздняя интерфаза или профаза	Метафаза	Анафаза	
Обин разрыб				Хроматидная делеция
				Изохроматидная делеция
Два разрыба				Внутривидовые обменные различия
				Внутривидовые обменные различия
				Внутривидовые обменные различия
				Внутривидовые обменные различия
				Внутривидовые обменные различия
				Внутривидовые обменные различия

Рис. 68. Основные категории хроматидных перестроек. По Н. П. Дубинину.

4. Материал фиксируют по Карнуа или в уксусном спирте и хранят в 70%-м растворе спирта.

5. Окрашивают корни в 2%-м растворе ацетокармина с кипячением на водяной бане в течение 10 мин. Затем материал переносят в 45%-й раствор уксусной кислоты на 5 мин.

6. Корень раздавливают в капле хлоралгидрата.

Основные категории хромосомных и хроматидных перестроек, которые наблюдают в анафазе и метафазе митоза, приведены на рисунках 67—68.

Изучить действие химических мутагенов метафазным методом можно также на скерде зеленой, семена которой с корнями длиной 1—2 мм обрабатывают этиленимином в концентрации 0,05% при pH 7,4 в течение 1 ч при температуре воздуха 25°C.

После промывания в течение одного часа от остатков этиленимина проростки обрабатывают 0,01%-м раствором колхицина и ставят в термостат с температурой 24—25°C. Максимум перестроек наблюдается через 16—24 ч.

Таким образом, для анализа перестроек хромосом необходимо во время воздействия тем или иным агентом учитывать фазу митотического цикла, чтобы знать, какие можно ожидать перестройки (хромосомные, хроматидные или те и другие). Желательно проследить число и типы перестроек на протяже-

нии всего первого митотического цикла после мутагенного воздействия, а для этого необходима темпоральная фиксация обработанного материала через определенные промежутки времени. Кроме того, учитывают специфику объекта и фактор воздействия.

Анафазный метод исследования. Если в практике селекционной работы приходится иметь дело с многохромосомными объектами, у которых идентификация хромосом не завершена или в кариотипе много морфологически сходных хромосом, при изучении действия мутагенов используют анафазный метод исследования. Однако он позволяет выявить меньше различных типов aberrаций хромосом, чем метафазный.

При изохроматидных делециях в анафазе видна пара хроматидных фрагментов, тогда как при обычной хроматидной делеции обнаруживается лишь одиночный фрагмент. Практически отличить хромосомную делецию, которая представляет собой пару параллельно расположенных фрагментов, от изохроматидной делеции в виде двух фрагментов очень трудно. Поэтому при анализе учитывают одиночные и двойные фрагменты, не указывая их происхождения.

Если произошла парацентрическая делеция, возникают ацентрический фрагмент и микрофрагмент. При перичентрической делеции затрагивается центромерный район, который, выпадая, образует центрическое кольцо (двойное в случае хромосомной делеции и одиночное в случае хроматидной) и фрагмент (двойной или одиночный).

Таким образом, делеции — источник фрагментов хромосом, которые располагаются между полюсами в анафазе и телофазе митоза. При анализе учитывают расстояние между анафазными группами. Оно должно быть больше ширины самой группы. На ранних этапах анафазы, когда расстояние между группами хромосом на полюсах небольшое, не удается выявить всех нарушений. Не рекомендуется исследовать клетки в период поздней телофазы, когда уже начал образовываться фрагмопласт.





Асимметричные транслокации обычно в анафазе обнаруживаются в виде мостов (см. рис. 64) и фрагментов. В зависимости от того, на каком этапе клеточного цикла возникло повреждение, мосты будут двойные или одиночные. При повреждении хромосом на стадии G_1 возникают хромосомные двойные мосты (параллельные или перекрещенные); если повреждение было на стадии G_2 , то возникают хроматидные одиночные мосты.

Для того чтобы овладеть анафазным методом, можно воспользоваться облученными или долго хранившимися семенами (у последних возможен спонтанный мутагенез). При изучении действия радиации число aberrантных клеток и спектр aberr-

раций неодинаковы при различных дозах облучения. В этом можно убедиться, просматривая клетки лука после облучения его семян в дозах 10 и 30 кР.

В ходе работы анализируют одновременно контрольный вариант и облученный. На последнем изучают первые митозы. У сухих зерен пшеницы, семян гороха клетки зародыша находятся в интерфазе в разных периодах (G_1 , G_2), поэтому возможно появление как хромосомных, так и хроматидных перестроек.

При наличии времени можно сравнить митотические индексы у разных вариантов. Затем необходимо выявить на препаратах и зарисовать одиночные, двойные и кольцевые фрагменты, одиночные и двойные мосты (с фрагментами и без них), отставшие хромосомы. Клетка может содержать не один, а несколько типов нарушений, что учитывают при анализе. Результаты подсчетов заносят в следующую таблицу:

Номер поля зрения	Число клеток						
	с нормальными хромосомами	с одиночными фрагментами (—)	с двойными фрагментами (=)	с мостами			с другими нарушениями
				хроматидными		хромосомными	
							

Установив общее число просмотренных клеток и клеток с нарушениями, определяют количество абберантных клеток (\mathcal{U} , %) по формуле

$$\mathcal{U} = \frac{A \cdot 100}{B},$$

где A — число клеток с нарушениями; B — общее число просмотренных клеток.

Если в одной клетке обнаружено несколько типов нарушений, число клеток с нарушениями будет меньше общего числа аббераций. Число аббераций на клетку (или 100 клеток) устанавливают, разделив общее число аббераций (C) на число просмотренных клеток (B).

Спектр аббераций (K) определяют в расчете на 100 клеток по формуле

$$K = \frac{D \cdot 100}{B},$$

где D — число аббераций определенного типа (например, одиночных мостов); B — число просмотренных клеток.

Долю aberrаций каждого типа от общего числа всех aberrаций устанавливают, разделив число aberrаций определенного типа, например одиночных мостов (D), на общее число aberrаций (C). Поврежденность клетки (%) определяют как отношение общего числа aberrаций (C) к числу aberrантных клеток (A).

Типы геномных мутаций

Каждый вид растений и животных характеризуется определенным диплоидным числом хромосом, которое поддерживается в клетках благодаря митозу. В результате мейоза образуются гаплоидные клетки. В гаплоидном наборе имеется по одной хромосоме от каждой пары гомологов. Восстанавливается диплоидность при оплодотворении.

В митозе и мейозе могут быть нарушения, которые приводят к изменению числа хромосом в клетках. Так, если в анафазе митоза хроматиды не расходятся к полюсам из-за отсутствия или повреждения веретена деления, то из диплоидных клеток возникают клетки с удвоенным числом хромосом, называемые *тетраплоидными*. Кратное увеличение числа хромосом по отношению к основному числу (X) называется *полиплоидией*. Например, у ржи основное число хромосом равно 7. У диплоидной ржи $2n=2X=14$, у тетраплоидной $2n=4X=28$. У диплоидной гречихи $2n=2X=16$, у тетраплоидной $2n=4X=32$. Таким образом, в соматических клетках тетраплоида число хромосом в четыре раза больше основного. Гаметы тетраплоидов имеют диплоидное число хромосом, в то время как у диплоидов гаметы несут гаплоидный набор хромосом.

Наиболее часто нарушение митоза вызывают действием водного раствора колхицина в концентрации 0,1—0,2%. Обработка колхицином прорастающих семян и конусов нарастания растений вызывает полиплоидизацию в клетках, что используют в селекции для получения исходного материала с ценными признаками и свойствами. Вызвать образование полиплоидов можно и другими способами:

если в мейозе биваленты не расходятся, то возникают нередуцированные гаметы с диплоидным числом хромосом. При оплодотворении из двух диплоидных гамет формируется тетраплоидный зародыш;

иногда удается вызвать полиплоидизацию зиготы во время первого деления. При этом возникает также тетраплоидный зародыш;

при опылении тетраплоидов пылью диплоидов того же вида образуются триплоиды. Так, при скрещивании тетраплоидной свеклы ($2n=4X=36$) с диплоидной ($2n=2X=18$) возникает триплоид ($2n=3X=27$).

Если полиплоиды получают путем увеличения числа наборов хромосом (точнее, геномов) одного вида растений, то их принято называть *автополиплоидами*, если же на основе разных видов растений — *аллополиплоидами*. Во втором случае происходит скрещивание разных видов между собой, например ржи и мягкой пшеницы, т. е. образуется отдаленный гибрид с $2n=28$ ($21+7=28$). Используя колхицин, можно увеличить вдвое число хромосом и получить из ржано-пшеничного гибрида тетраплоид с 56 хромосомами. Кратное увеличение наборов хромосом у отдаленного гибрида называется *амфидиплоидией*.

Г. Д. Карпеченко первым получил амфидиплоид от скрещивания редьки ($2n=18$) и капусты ($2n=18$). Этот гибрид имел в F_1 (первое поколение) $2n=18$. Вследствие того что конъюгация хромосом редьки и капусты в мейозе отсутствовала, гаметы гибрида оказались нежизнеспособными. В отдельных случаях все-таки были получены нередуцированные гаметы, от слияния которых образовался плодовой амфидиплоид с 36 хромосомами.

А. Р. Жебрак получил амфидиплоиды от скрещивания различных видов пшениц между собой. Так, от скрещивания мягкой пшеницы ($2n=42$) с пшеницей Тимофеева ($2n=28$) был получен амфидиплоид с 70 хромосомами. Естественные автополиплоиды известны у таких культур, как картофель, люцерна, ежа сборная, тимopheевка, арахис, кофейное дерево, сахарный тростник.

Примеры естественных аллополиплоидов — мягкая пшеница, овес, просо, хлопчатник, табак, земляника. Следует отметить, что у естественных аллополиплоидов хромосомы в мейозе нередко конъюгируют попарно, как у диплоидов. Например, у мягкой пшеницы образуется 21 бивалент. Ведущая роль в бивалентной конъюгации у мягкой пшеницы принадлежит 5В хромосоме, в которой выявлен доминантный ген Rh , ответственный за конъюгацию гомологов. Известны и автоаллополиплоиды, как, например, топинамбур ($2n=102$), имеющий 4 генома A_1 и 2 генома B_1 . Экспериментально полученные автополиплоиды ($2n=4X$) таких культур, как рожь, гречиха, клевер луговой, занимают в производстве значительные площади. Широко используют и триплоиды ($2n=3X$) сахарной свеклы, арбуза, банана, яблони. Из аллополиплоидов наибольшее распространение имеет тритикале.

Анеуплоидом называют организм, у которого число хромосом не кратно основному числу. Если в процессе оплодотворения нормальная гаплоидная мужская гамета сочетается с женской гаметой, несущей одну лишнюю хромосому ($n+1$), возникает зигота с числом хромосом $2n+1$. Такие организмы называют *трисомиками*, так как у них трижды повторена одна

из гомологичных хромосом (рис. 69). Организмы с числом хромосом $2n-1$ называют *моносомиками*. При потере одной пары гомологичных хромосом возникают нуллисомики ($2n-2$). Анеуплоиды чаще всего образуются вследствие нарушений мейоза, когда не расходятся одна или несколько пар хромосом.

Значение анеуплоидов возрастает в связи с возможностью замены хромосом одного вида хромосомами другого, особенно при получении в селекции форм, устойчивых к заболеваниям, а также при генетических исследованиях, когда предстоит выявить наследственное значение каждой хромосомы, чтобы показать, как влияет отсутствие той или иной из них на развитие определенных признаков у растений и их жизнеспособность. Наибольшую известность получили серии анеуплоидных растений, у которых отсутствуют одна или две хромосомы (моно- и нуллисомики), созданные у пшеницы.

Выявляют анеуплоиды путем подсчета хромосом в митозе или мейозе. В последнем случае недостающие или лишние хромосомы обнаруживаются в виде унивалентов.

Выявление полиплоидных растений цитологическими методами

В практической работе особенно большое значение имеют методы быстрого выявления полиплоидных растений. Их определяют как по внешним морфологическим признакам, так и цитологическими методами, к которым относятся следующие.

1. Определение числа хромосом в соматических клетках корней или молодых листочков.

2. Измерение величины замыкающих клеток устьиц в эпидермисе, а также подсчет числа устьиц на единицу листовой поверхности.

3. Измерение величины ядер в клетках эпидермиса и подсчет числа ядрышек в ядрах.

4. Подсчет числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц.

5. Измерение диаметра и изучение формы пыльцевых зерен, а также подсчет числа пор в них.

6. Изучение мейоза, который не всегда нормально протекает у только полученных полиплоидов, а поэтому тетрады микроспор оказываются с микроядрами и фертильность пыльцы нередко понижена.



Рис. 69. Хромосомы трисомика вики. По И. Н. Свешниковой.

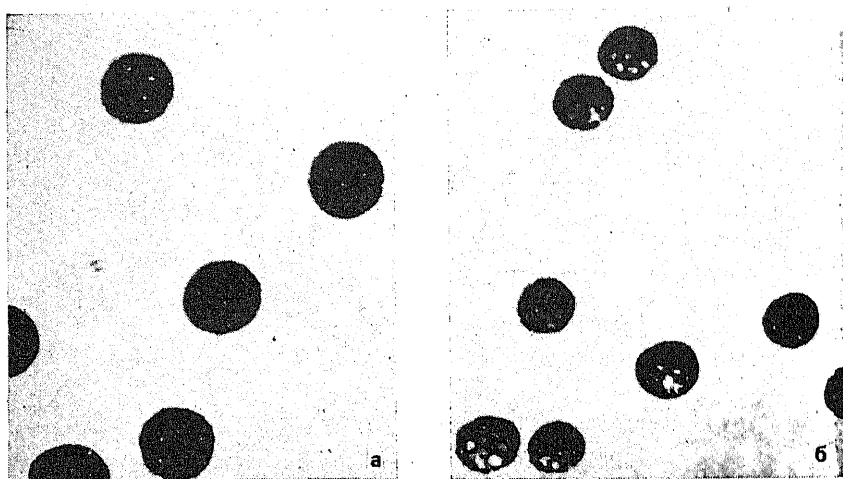


Рис. 70. Сравнение размеров пыльцевых зерен у тетраплоидного (слева) и диплоидного (справа) флоксов. По Эйгсти и Дастин.

Наиболее надежный из указанных методов — определение числа хромосом. Для этого из корней или молодых листочков готовят давленные препараты (см. с. 97). Из косвенных методов выявления полиплоидных растений часто используют второй, третий, четвертый и пятый. У полиплоидов более крупные замыкающие клетки устьиц, ядра клеток эпидермиса и пыльцевые зерна (рис. 70). Чтобы обеспечить сравнимость результатов, желательно у диплоидов и полиплоидов измерения проводить на листьях и соцветиях одних ярусов, так как в пределах одного растения величина клеток несколько варьирует.

Методика сравнительного изучения устьиц и хлоропластов у диплоидов и полиплоидов следующая.

1. Из листьев одного яруса отбирают образцы с помощью дырокола.

2. Помещают образцы в ледяную уксусную кислоту на ночь.

3. Окрашивают клетки в йоде с йодидом калия. Для приготовления красителя берут 5 г металлического йода и 10 г йодида калия, растирают в ступке, а затем растворяют в 100 мл воды.

На препаратах можно не только подсчитать число хлоропластов, но и провести их измерение.

Для определения числа пор в пыльцевых зернах иногда необходима их специальная обработка. Так, в Польше пыльцу гречихи на предметном стекле обрабатывают смесью, состоящей из четырех частей ледяной уксусной кислоты и одной части серной кислоты. Через 15—120 мин после обработки по числу

плазматических выпусков определяют количество пор: у диплоида их три, у тетраплоида — четыре.

Следует заметить, что при обработке колхицином проросших семян далеко не все клетки оказываются полиплоидными, часть из них остается диплоидными. Такое явление называется *миксоплоидией*, а организмы, в которых имеются ткани различной пloidности, — миксоплоидами. Термин ввел Немец в 1910 г. Миксоплоидия приводит к образованию *химер* — растений, у которых одни ткани диплоидные, а другие полиплоидные. Так, у кукурузы в год обработки колхицином в пределах одного растения и даже початка могут образоваться зерновки различной степени пloidности, что вызывает необходимость проверки числа хромосом в корнях проросших зерновок.

Методы выявления гаплоидов

Кроме диплоидов, полиплоидов, анеуплоидов, в селекции растений приходится иметь дело с *гаплоидами* — организмами, клетки которых содержат гаметический набор хромосом. Гаплоиды возникают из неоплодотворенных клеток зародышевого мешка или из яйцеклеток, у которых ядро элиминировалось и оказалось замещенным ядром спермия. Первый гаплоид был получен экспериментальным методом Блексли в 1922 г. у дурмана (*Datura stramonium*). Моррисону в 1932 г. удалось получить первую homozygotную линию из гаплоида томата. Гаплоидия установлена у 152 видов, не считая гибридных форм. Биотехнологи получают гаплоиды в культуре клеток из пыльников, когда пыльцевые зерна имеют одно ядро.

Выявление гаплоидов осуществляют цитологическим методом на основе изучения числа хромосом. Однако этот метод очень трудоемкий, поэтому часто эти организмы учитывают по другим признакам. Гаплоиды отличаются от диплоидов меньшими размерами вегетативных и репродуктивных органов, мелкими клетками, низкорослостью, стерильностью, слабым развитием. Поэтому нередко сравнивают гаплоиды и диплоиды по размерам клеток эпидермиса и устьиц листа, размеру и стерильности пыльцы, хромосомным aberrациям, митотическому циклу и т. д. Чейз в 1955 г. установил, что у гаплоида кукурузы первый лист в два раза короче такого же листа исходной линии. Для выявления гаплоидов у огурца Алдерс погружал сухие семена в воду, разбавленную соляной кислотой. Среди всплывших семян были обнаружены гаплоиды.

Если в одной семязпочке развивается несколько зародышей, то те проростки, которые слабее развиты, могут оказаться гаплоидами. На этом основан близнецовый метод выявления гаплоидов. Однако при всех указанных методах их выявления необходима цитологическая проверка числа хромосом.

На генетическом маркировании и скрещивании основан еще один метод. Например, для кукурузы по методике Чейза подбирают диплоидную материнскую линию с рецессивными признаками и диплоидную отцовскую линию с доминантными признаками. Гибридное потомство анализируют в фазе проростков. Отбирают все диплоиды с доминантными признаками, а проростки с рецессивными признаками проверяют на гаплоидность.

Образование гаплоидов происходит в культуре тканей и клеток из пыльников на стадии одноядерных пыльцевых зерен, при опылении растений облученной или чужеродной пылью, воздействием химических мутагенами, температурой и т. д.

Среди тетраплоидов также возможно образование гаплоидов, т. е. особей с гаметическим набором хромосом. Однако в этом случае гаплоид содержит не один, а два генома (дигаплоид) или более.

Геномный анализ аллополиплоидов

Геномный анализ — это один из цитогенетических методов исследования. Цитогенетика изучает связь явлений наследственности с поведением и структурой хромосом.

Под геномом понимают гаплоидный набор хромосом с локализованными в нем генами. Известно, что диплоидные клетки организма имеют два одинаковых генома, например АА, а гаплоидные клетки — один (А). В отличие от диплоидов автополиплоиды несут в соматических клетках более двух гомологичных геномов: триплоиды — три генома, тетраплоиды — четыре и т. д. Аллополиплоиды также имеют несколько геномов в соматических клетках, но эти геномы разные, так как происходят от разных видов. Например, мягкая пшеница имеет шесть геномов в соматических клетках — AABBDD.

До недавнего времени считалось, что источником генома А у мягкой пшеницы является пшеница однозернянка *T. monosocum* или *T. boeoticum*. Использование иммунохимического метода (Конарев, 1983) показало, что источник этого генома — пшеница однозернянка (*T. urartu*) или близкая ей форма, генома В — эгилопс (*Ae. longissima*) или близкая ему форма, генома D — эгилопс [*Ae. tauschii* (-*Ae. squarrosa*)].

Для изучения происхождения геномов у аллополиплоидов и сложных отдаленных гибридов применяют геномный анализ. При этом аллополиплоид скрещивают с предполагаемым родительским видом, а затем у полученного гибрида анализируют поведение хромосом в мейозе и проверяют плодовитость потомства. Родство геномов устанавливают на основе конъюгации в мейозе гомологичных хромосом, происходящих от разных родителей.

При проведении геномного анализа необходимо четко представлять различие между гомологичными и гомеологичными хромосомами.

Рис. 71. Идиограмма хромосом мягкой пшеницы, составленная на основе измерений у сорта Уичита. По Джиллу с соавт.

Гомологичные хромосомы имеют одинаковые размеры, форму и тождественную генетическую функцию. Во время мейоза две такие хромосомы, происходящие от разных родительских форм одного генома (например, А), вступают в конъюгацию, образуя биваленты. У гомологичных хромосом проявляется, таким образом, генетическое и цитологическое родство.

Гомеологичные хромосомы относятся к разным геномам одного ядра, например А и В. Они могут отличаться по форме и величине, что видно из идиограммы мягкой пшеницы (рис. 71), но проявляют генетическое родство, т. е. обладают близкой генетической функцией.

Сирс в 1952—1954 гг. установил, что гаплоидный набор хромосом мягкой пшеницы, состоящий из трех геномов А, В, D, можно разделить на семь гомеологичных групп по три хромосомы в каждой (от каждого генома по одной хромосоме). Гомеологичные хромосомы могут вступать в конъюгацию только при отсутствии пятой хромосомы генома В, в которой находятся гены — подавители конъюгации гомеологов.

При проведении геномного анализа фиксируют пыльники для изучения мейоза, используя уксусный спирт (3:1) или фиксатор Ньюкомера. Окрашивать препараты можно ацетокармином. Анализ удобно вести в метафазе I мейоза, в которой легко отличить биваленты от унивалентов и на основании конъюгации хромосом составить представление об их гомологии (см. с. 230).

Гомеологичная группа	Геном		
	А	В	D
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			

МЕЙОЗ И ГАМЕТОГЕНЕЗ

МЕЙОЗ

Большинство высших растений размножается половым путем. Половое размножение связано с образованием гаплоидных клеток и с последующим слиянием мужских и женских гамет. Для образования гаплоидных клеток должен существовать механизм, при помощи которого число хромосом уменьшается вдвое, т. е. клетка из диплоидного состояния переходит в гаплоидное. Без этого невозможно сохранение у видов в последующих поколениях свойственного им кариотипа. Такой переход осуществляется во время особого клеточного деления — мейоза (греч. мейозис —

уменьшение), или *редукционного деления* (лат. *reducere* — отводить). Термин мейозис предложили Фармер и Мур в 1905 г. Мейоз открыт почти одновременно с митозом Ван-Бенеденом в 1884 г.

Процесс редукционного деления протекает у цветковых растений до их цветения в молодых пыльниках и семяпочках и предшествует образованию гамет. Его определяют как специальный тип деления дифференцирующихся половых клеток или спор. Мейоз у растений наблюдали еще в конце XIX в. В. И. Беляев, Страсбургер, Гиньяр и другие ученые.

У животных мейоз проходит при образовании гамет и является составной частью овогенеза и сперматогенеза, а у цветковых растений — во время микро- и мегаспорогенеза, т. е. до образования гамет. У растений продуктом мейоза являются гаплоидные микро- и мегаспоры, а гаметы образуются позднее, после двух митотических делений гаплоидных микроспор или трех митотических делений гаплоидных мегаспор. Кроме того, у растений мейоз связан с процессом чередования поколений — спорофита и гаметофита — в одном жизненном цикле.

Спорофит и гаметофит — это различные поколения в онтогенезе растений. Первый из них у цветковых растений длится долго и характеризуется диплоидным состоянием клеток. Мейоз осуществляется на последнем этапе развития спорофита. Стадия гаметофита непродолжительна по времени. Из микро- и мегаспор образуются мужской и женский гаметофиты, т. е. поколения клеток с гаплоидным набором хромосом. При развитии гаметофита образуются гаметы. Слияние мужской и женской гамет приводит к образованию зиготы, которая дает начало новому спорофиту.

Типы мейоза

В зависимости от того, на каком этапе онтогенеза происходит мейоз, различают три его типа:

зиготический — наблюдается у низших растений сразу после образования зиготы, в результате него образуются тетрады гаплоидных спор;

гаметический — происходит в гаметообразующих клетках животных и человека, и в итоге образуются гаплоидные гаметы;

промежуточный, или спорный, — протекает в микро- и мегаспорозитах в фазу бутонизации цветковых растений, завершаясь образованием гаплоидных микро- и мегаспор.

Мейоз — составная часть мейотического цикла, состоящего из интерфазы и мейоза. В сравнении с митозом мейоз имеет ряд отличительных особенностей. Одна из них заключается в том, что в предмейотической интерфазе мейоза синтезируется 99,7% ДНК, а остальное количество ее образуется в профазе мейоза. Предмейотический синтез дольше митотического. Кроме того, пе-

риод синтеза гистонов в мейотическом цикле не совпадает с периодом синтеза ДНК, т. е. эти процессы идут асинхронно. Синтез ДНК у растений завершается на первых стадиях профазы I мейоза, а именно в зиготене — пахитене.

Одна из причин перехода клеток к мейозу — существование индукционных механизмов, и в частности ферментов, поступающих из тапетума. Существует гипотеза о том, что вступление клеток в мейоз обусловлено генетически. У кукурузы выявлен ген *at*, блокирующий вступление клетки в мейоз. Продолжительность мейоза у растений больше, чем митоза (у лука — 4 сут, у мягкой пшеницы — 2 сут).

Мейоз состоит из двух делений (I и II), следующих одно за другим. Первое деление называют *редукционным*, второе — *эквационным*. Они неравноценны, хотя и имеют одинаковые фазы: профазу, метафазу, анафазу и телофазу. В ходе этих двух делений из одной исходной клетки образуются четыре гаплоидные, а хромосомы удваиваются только один раз перед первым делением. В результате каждая хромосома становится дихроматидной. В первом же делении мейоза протекает *конъюгация* гомологичных хромосом, приводящая к образованию пар хромосом, или *бивалентов*. В это время весь диплоидный набор хромосом разбивается на определенное число бивалентов. Мейотическая конъюгация осуществляется в три этапа: первый — сближение гомологов, второй — синапсис (греч. синаптос — соединенный), третий — точное молекулярное спаривание коротких отрезков ДНК, содержащих сходные последовательности оснований. В сближении гомологов активную роль играет ядерная мембрана.

В 1956 г. Мозес открыл в составе бивалентов хромосом новую ультраструктуру — *синаптонемный комплекс* (рис. 72) в виде трехслойной ленты, состоящей из центрального и двух боковых элементов. Есть предположение, что эта ультраструктура, видимая в электронный микроскоп, необходима для удержания гомологов в биваленте и нормального их расхождения. Позднее члены

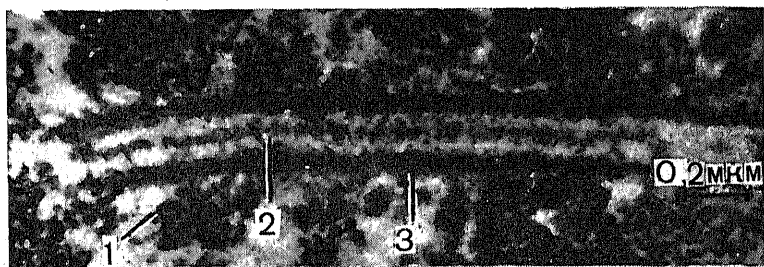


Рис. 72. Синаптонемный комплекс в пахитене микроспороцита лилии: 1 — хроматин; 2 — центральный элемент; 3 — боковые элементы. По Моенс.

каждой пары хромосом (гомологи) расходятся к разным полюсам. На каждом полюсе оказывается по одному гомологу от пары, а в совокупности — гаплоидное число дихроматидных хромосом.

Таким образом, в интерфазе мейоза происходит основной синтез ДНК (каждая хромосома становится дихроматидной), в первом делении наблюдается временное сближение дихроматидных гомологичных хромосом, а затем их расхождение к разным полюсам. Процесс расхождения каждой пары хромосом протекает независимо от других, а число возможных сочетаний материнских и отцовских хромосом на каждом полюсе определяется у гетерозигот по формуле 2^n , где n — гаплоидное число хромосом. Хромосомы остаются удвоенными до анафазы II.

Так образуются гаплоидные клетки. Состав хромосом разных гаплоидных клеток может быть неодинаковым в результате различных сочетаний материнских и отцовских хромосом на полюсах после расхождения. Таким образом, один и тот же гетерозиготный генотип (например, AaBb) способен образовывать гаметы с одинаковым (гаплоидным) числом хромосом, но с различным их сочетанием, что сказывается на генотипе гамет (AB, Ab, aB, ab). Гаметы AB образованы материнскими хромосомами, ab — отцовскими, Ab и aB — материнскими и отцовскими.

В профазе первого деления мейоза, кроме конъюгации, у гетерозигот происходит в пахитене другой очень важный процесс — *кроссинговер* (англ. crossing over — перекрест), т. е. обмен гомологов нитями ДНК. Этот процесс цитологически установили на дрозофиле К. Штерн, а на кукурузе — Б. Мак Клинток и Г. Крейтон. Кроссинговер протекает с участием ферментов эндонуклеаз, лигаз и полимераз. Обнаружены гены, влияющие на конъюгацию хромосом в мейозе, например локус Ph, расположенный в хромосоме 5B у мягкой пшеницы; наличие этого локуса обеспечивает нормальную конъюгацию гомологичных хромосом.

Кроссинговер, или перекрест гомологичных хромосом, приводит к существенному изменению их генного состава. Внутри бивалента, который состоит из четырех хроматид, происходит разрыв двух неестринских хроматид и обмен нитями ДНК. Итак, «молекулярная машина» кроссоверного обмена включает участие ферментов и пахитенной ДНК.

Обмен генами приводит к рекомбинации, и хроматиды оказываются комбинированными, так как содержат часть генов от материнской хромосомы и часть от отцовской. Такой процесс создает возможность наследственного варьирования в потомстве. Не случайно кроссинговер играет ключевую роль в эволюции и селекции.

По данным молекулярной генетики, гомологи могут обмениваться и более мелкими участками ДНК — нуклеотидами.

Отсюда возникло представление о *реконе* — единице рекомбинации в процессе кроссинговера.

В последние годы конъюгацию и кроссинговер усиленно изучают. Выявлено, что в зиготене дополнительно синтезируется *z*-ДНК, состоящая из уникальных последовательностей, которая распределена небольшими участками вдоль всех хромосом. Полагают, что эти участки ДНК необходимы для «узнавания гомологов», а связь гомологов осуществляется при помощи синаптонемного комплекса.

В пахитене дополнительно синтезируется *n*-ДНК, состоящая из повторяющихся последовательностей. Именно эта ДНК подвергается разрывам с участием ферментов рН5,2-никаз, что обеспечивает возможность кроссоверного обмена нитей ДНК.

Таким образом, благодаря мейозу клетки переходят с диплоидного уровня на гаплоидный, и, кроме того, у гетерозигот осуществляется мейотическая рекомбинация, которая является краеугольным камнем селекции.

Помимо мейотического, редко, но встречается соматический кроссинговер во время митоза у грибов.

Фазы мейоза

Первое деление мейоза включает профазу I, метафазу I, анафазу I и телофазу I.

Профаза I сложная и длится довольно долго (от нескольких часов до нескольких дней у полевых культур). Эта фаза состоит из нескольких стадий: лептотены, зиготены, пахитены (греч. лептос — тонкий; тена — пряжа, двойная нить; зигон — двойная упряжка; пахитерос — толще), диплотены и диакинеза (рис. 73 и 74).

В *лептотене* хорошо видны тонкие, сильно деконденсированные хромосомные нити. Каждая хромосома имеет свой рисунок — хромомер. На этой стадии число хромосом диплоидно, дихроматидность не видна в световой микроскоп.

В *зиготене* происходит взаимное притяжение гомологических хромосом — конъюгация. Этот процесс начинается с какой-то определенной точки и распространяется по всей длине хромосомы.

В течение лептотены — зиготены у растений наблюдается сжатие хромосом в клубок — синезис, а у животных — образование фигуры «букета». Во время образования этих фигур хромосомы ориентируются теломерными концами к одному из полюсов.

В *пахитене* конъюгация хромосом заканчивается. Пары хромосом — биваленты — видны лучше. Удастся установить гаплоидное число бивалентов. В каждый бивалент входит четыре хроматиды, так как каждая хромосома удвоена. На этой стадии

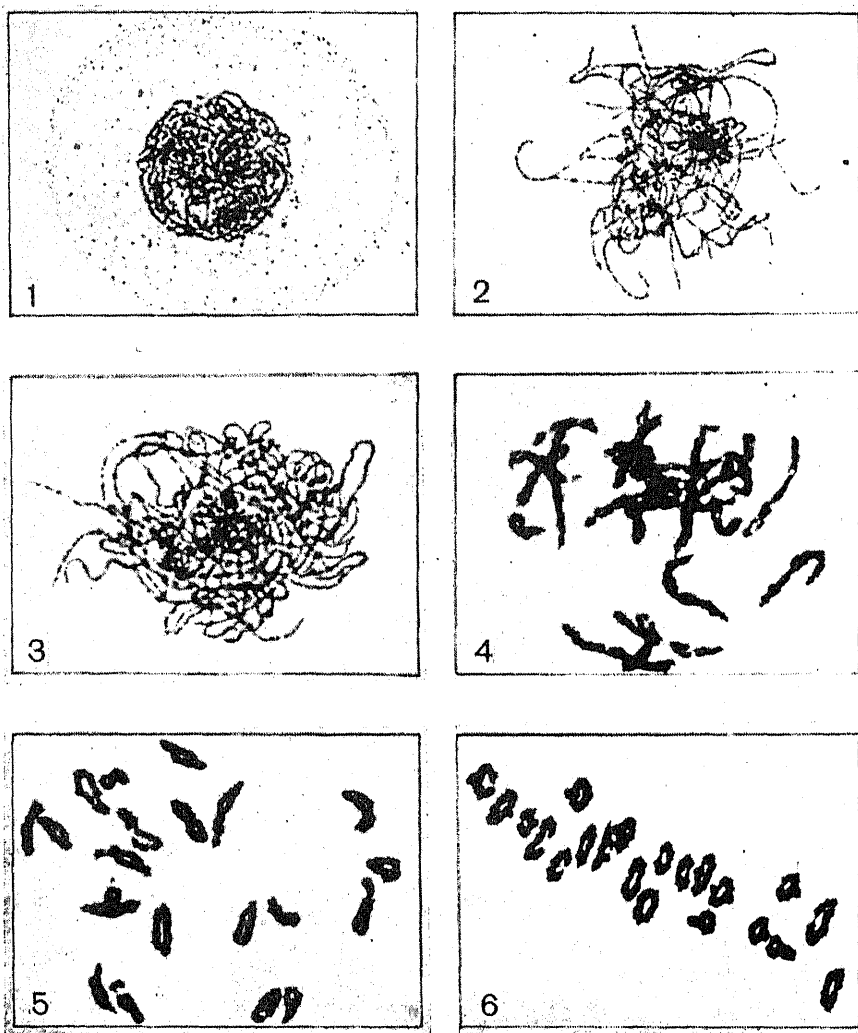


Рис. 73. Профаза I и метафаза I мейоза у мягкой пшеницы:
1 — лептотена; 2 — зиготена; 3 — пахитена; 4 — диплотена; 5 — диакинез; 6 — метафаза I. По Sutka.

проводят тонкое изучение строения хромосом. Приготовление препаратов для такого анализа описано на странице 203.

При параллельном расположении четырех хроматид они нередко закручиваются одна возле другой. Датский цитолог Янсенс предположил, что во время скручивания хроматид возможен их

разрыв. Если разорванные концы несестринских хроматид соединятся, то возникнут комбинированные хроматиды. Цитологически перекрест хроматид обнаруживается по наличию *хиазм* на следующем этапе. Перекрещивание хроматид в диплотене напоминает греческую букву χ (хи). Впервые они описаны Рюккертом в 1892 г.

В *диплотене* начинают действовать силы, способствующие разъединению конъюгирующих хромосом в биваленте. Разъединение начинается с центромер, но не доходит до конца, так как хроматиды оказываются перекрещенными в результате перехода их от одной хромосомы к другой. В результате хромосомы образуют петли с хиазмами.

В *диакинезе* резко укорачиваются хромосомы бивалентов, хиазмы соскальзывают к концам хроматид (*процесс терминализации*), а биваленты изменяют свою форму в зависимости от характера кроссинговера (рис. 75). Хромосомы бивалента, имеющие на концах центромеры, после одинарного кроссинговера и сползания хиазм к дистальным концам принимают палочковидную форму. Центромеры оказываются на противоположных концах, а дистальные концы плотно прилегают друг к другу в центре бивалента. Метacentрические хромосомы бивалента после двойного кроссинговера принимают кольцевую форму. При этом оба

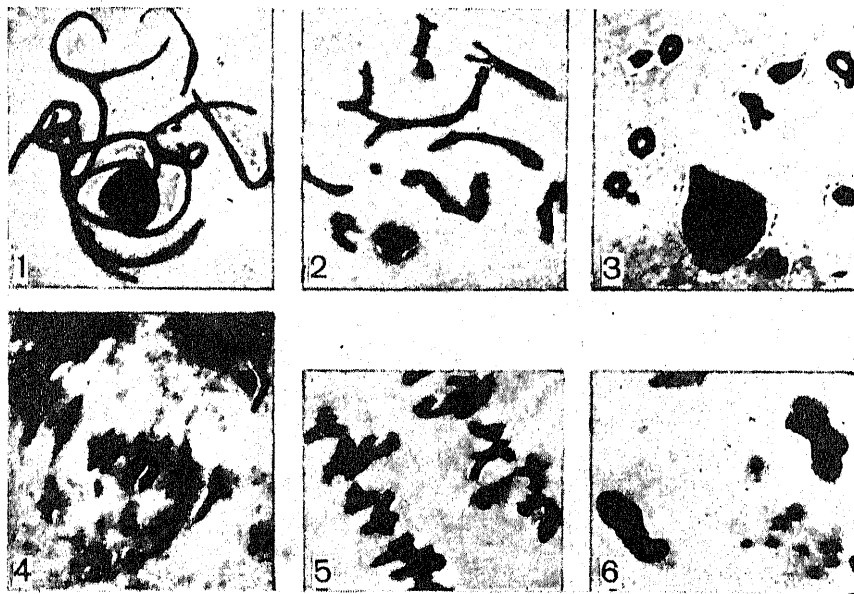


Рис. 74. Первое деление мейоза у кукурузы (*Zea mays*):

1 — пахитена; 2 — диплотена; 3 — диакинез; 4 — метафаза I; 5 — анафаза I; 6 — телофаза I. По Мюнтцингу.

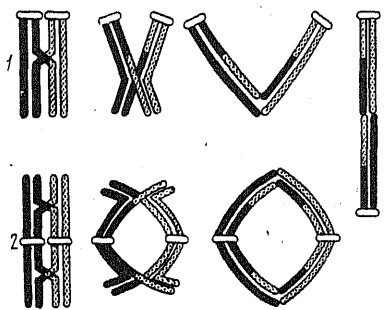


Рис. 75. Схема терминализации хиазм: 1 — при одинарном перекресте (телоцентрическая хромосома); 2 — при двойном перекресте (метацентрическая хромосома). По М. Е. Лобашеву.

дистальных конца одной хромосомы оказываются соединенными с двумя дистальными концами другой хромосомы бивалента. Центромеры располагаются в кольце одна против другой. Кроме указанных форм, биваленты могут быть в виде восьмерок. Располагаются они по периферии ядра и удобны для подсчета. Например, у ржи в диакинезе семь бивалентов, у кукурузы — десять и т. д.

Так заканчивается профазы первого деления мейоза. Вслед за этим исчезают ядерная оболочка, ядрышко и начинается перемещение бивалентов в экваториальную плоскость клетки. У некоторых животных объектов в профазе I выявляются *хромосомы типа ламповых щеток*, что связано с активацией транскрипции хромосом.

В метафазе I появляется веретено, и каждый бивалент располагается в экваториальной зоне. Поскольку бивалент имеет две центромеры, то их ориентация отличается от метафазы митоза. Обе центромеры устанавливаются симметрично по отношению к экваториальной плоскости и направлены к разным полюсам. Центромерами хромосомы прикрепляются к веретену. В митозе хромосомы имеют по одной центромере, и все они устанавливаются в одной экваториальной плоскости. На этом заканчивается подготовка хромосом к расхождению.

В анафазе I гомологичные хромосомы расходятся к разным полюсам. Каждый бивалент после полного исчезновения хиазм распадается на две дихроматидные хромосомы, одна из которых идет к одному полюсу, другая — к противоположному. От каждой пары гомологов на полюсе оказывается по одной удвоенной хромосоме, а в совокупности — гаплоидное их число, т. е. число хромосом уменьшается вдвое. В первом делении мейоза центромеры не делятся, как это было в митозе, поэтому каждая хромосома гаплоидного набора состоит из двух хроматид.

В телофазе I формируется ядерная оболочка, но дихроматидные хромосомы не конденсируются. Образуются две клетки, ядра которых содержат вдвое меньше хромосом, чем ядро исходной клетки. Затем после непродолжительной подготовки к следующему делению, т. е. интеркинеза, в котором не происходит удвоения хромосом, обе клетки, обычно синхронно, вступают во второе деление мейоза. Последнее мало отличается от митоза по своему механизму, но имеет некоторые особенности.

Профаза II может быть очень короткой и редко обнаруживается на препаратах.

В метафазе II удвоенные хромосомы выстраиваются в экваториальной плоскости веретена деления. Центромеры делятся, как во время митоза. Каждая хроматида становится самостоятельной.

В анафазе II к полюсам расходятся хроматиды. У гетерозигот они не идентичны, как в митозе, потому что участвовали в кроссинговере. Итак, хроматиды, которые наблюдались еще в первом делении мейоза, расходятся к полюсам только во втором делении. На каждом полюсе клетки оказывается гаплоидное число монохроматидных хромосом.

В телофазе II формируются гаплоидные ядра, происходит цитокинез. После двух делений из одной клетки с диплоидным набором хромосом образуются четыре — с гаплоидным.

Изучение мейоза и образования гамет необходимо при исследовании цитологических основ расщепления гибридов, сцепленного наследования признаков, геномного анализа и т. д.

Мейоз у цветковых растений протекает в пыльниках и семяпочках во время микро- и мегаспорогенеза. Рассмотрим эти процессы, чтобы научиться практически распознавать все фазы мейоза.

МИКРОСПОРОГЕНЕЗ

Процесс образования микроспор в пыльниках цветковых растений сопряжен с мейозом и называется микроспорогенезом.

Для наблюдения мейоза в пыльниках цветков необходимо зафиксировать колосья ржи, ячменя, пшеницы или метелки кукурузы до их выхода из влагалища листа или реже — когда молодой колос или метелка только показались наружу. Из бобовых хороший объект для изучения мейоза — конские бобы, у которых фиксируют небольшие бутоны до приобретения ими окраски венчика. Применяют фиксатор Карнуа или уксусный спирт. Можно использовать фиксаторы Ньюкомера и другие в зависимости от способа приготовления препаратов и их окраски. После промывания фиксированный материал хранят в 70—80%-х растворах спирта.

Мейоз можно проследить на временных и постоянных препаратах, приготовленных из молодых пыльников. Методика приготовления препаратов для изучения мейоза приведена на странице 202.

Совокупность всех тычинок в цветке принято называть *андроцеем*. Каждая тычинка состоит из пыльника, связника и тычиночной нити. Пыльник обычно состоит из двух половинок, называемых *тэками*, или *сумками*. Они расположены по обе стороны связника. Каждая половина пыльника имеет два гнезда —



Рис. 76. Микроспороциты в пыльнике гречихи (микротомный препарат).

пыльцевые мешки. На поперечном разрезе пыльника можно рассмотреть все четыре гнезда.

На ранних этапах развития пыльника его меристематические клетки мало чем отличаются друг от друга по внешнему виду, т. е. форме и величине. Позднее появляются крупные клетки — *первичные клетки археспория*. Они делятся и дают начало *париетальным* и *вторичным клеткам археспория*. Клетки, вступающие в мейоз, называют *материнскими клетками микроспор*, или *микроспороцитами* (рис. 76). Париетальные клетки вместе с клетками эпидермиса образуют стенки пыльника. Слой клеток пыльника, примыкающий к эпидермису, называют *фиброзным слоем*, или *эндотецием*. Он способствует вскрыванию пыльника. Непосредственно к микроспороцитам примыкает *выстилающий слой*, или *тапетум*.

На постоянных микротомных препаратах, окрашенных гематоксилином по Гейденгайну, видно, что каждое гнездо пыльника имеет комплекс микроспороцитов с крупными диплоидными ядрами. У злаковых эти клетки по форме нередко напоминают многоугольники, плотно примыкающие друг к другу. Именно они вступают в мейоз. На срезах пыльников видны 4 слоя: эпидермис, средний слой (он дифференцируется в эндотеций), тапетум и микроспороциты.

Рассмотрим отличительные признаки отдельных стадий профазы I. В лептотене хромосомы представлены в виде тонких, слабо конденсированных нитей, имеющих небольшие вздутия —

хромомеры. В зиготене обнаруживается попарное сближение хромосом. На следующей стадии — пахитене — гомологичные хромосомы укорочены и утолщены. Хромомерное строение хромосом проявляется особенно четко. При работе с иммерсионным объективом видно, что конъюгация хромосом происходит в соответствии с хромомерным строением. Например, крупная хромомера одной хромосомы плотно прилегает к такой же крупной хромомере другой. Хромосомы лежат парами. К концу этой фазы обнаруживается, что каждая хромосома бивалента состоит из двух хроматид. Диплотена отличается тем, что хромосомы образуют петли; на этой стадии видны хиазмы. В диакинезе биваленты еще больше укорочены, имеют минимум хиазм и разбросаны по всему ядру. Форма их не одинакова.

На всех рассмотренных стадиях профазы I хорошо видно ядрышко, которое связано с определенной парой хромосом; сохраняется и ядерная оболочка.

В метафазе I отсутствует ядерная оболочка, биваленты собраны в экваториальной зоне и прикреплены к нитям веретена двумя центромерами. Ядрышко отсутствует. Биваленты короткие и утолщенные, интенсивно окрашены.

В анафазе I каждый бивалент распадается на две гомологичные хромосомы, направляющиеся к разным полюсам.

В телофазе I (рис. 77, а) хромосомы конденсированы. В конце этой фазы у злаковых происходит цитокинез. Из одной клетки образуются две, значительно отличающиеся по форме от исходной. Обе клетки (диада) вступают в интеркинез.

Следует обратить внимание, что в течение первого деления мейоза изменяется форма клеток, вступивших в мейоз. Они постепенно округляются, особенно в метафазе, анафазе и телофазе, что хорошо наблюдать у злаковых культур. В интеркинезе обе клетки диады имеют форму плосковыпуклых линз. Их содержимое окружено каллозой (полисахарид 1,3-β-глюкан). В течение первого деления мейоза уменьшается содержание РНК, идет элиминация рибосом. В профазе I разрушаются клеточные стенки и заменяются оболочками из каллозы.

Во втором делении мейоза восстанавливается уровень рибосом. Метафаза II отличается от метафазы I тем, что одновременно в двух клетках видно веретено деления. В экваториальной плоскости каждого веретена находится группа хромосом (рис. 77, б). Хромосомы метафазы II более длинные, чем метафазы I.

В анафазе II хроматиды расходятся, и когда расхождение завершается, то в обеих клетках одновременно четко видны полюса с хромосомами.

В телофазе II хромосомы на полюсах теряют свою форму, постепенно формируются ядро и ядрышко. После цитокинеза возникает тетрада гаплоидных микроспор. Каллоза растворяется фер-

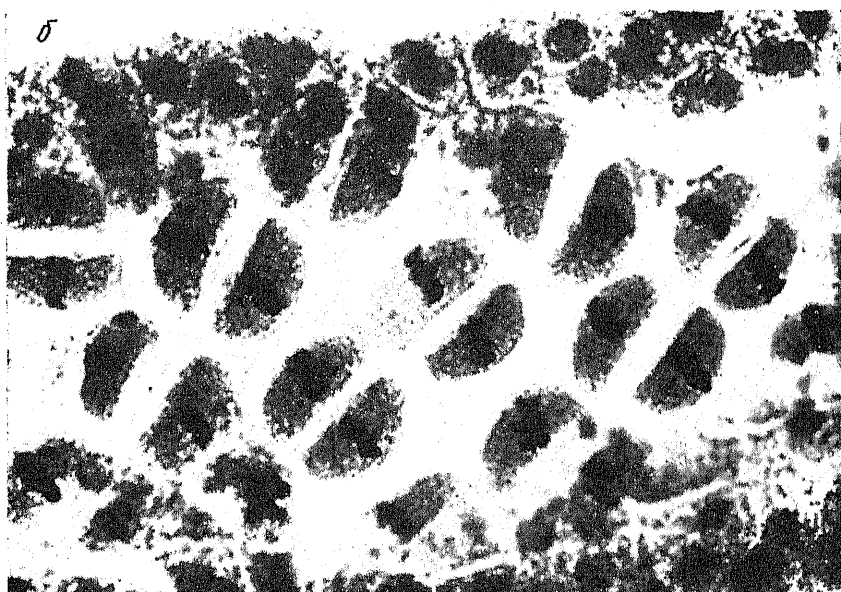
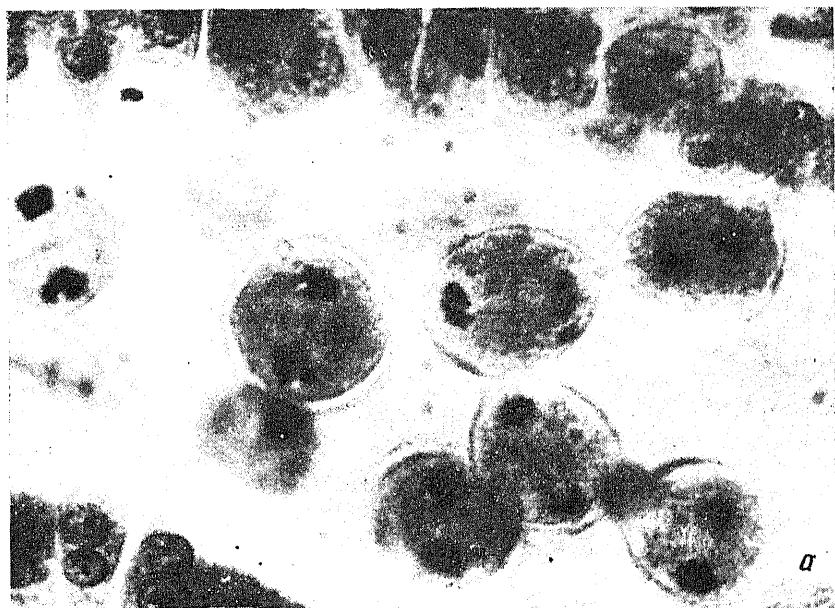
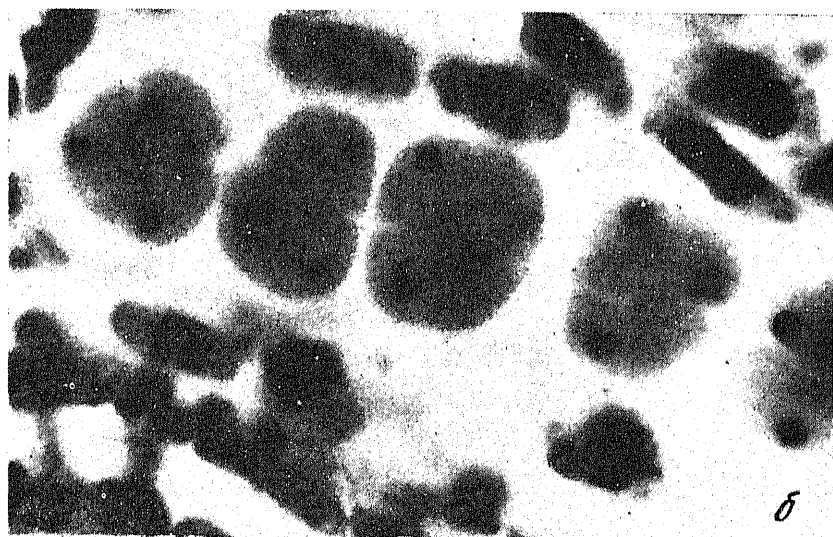


Рис. 77. Первое (а) и второе (б) мейотические деления в пылинке ржи (микротомные препараты).



a



b

Рис. 78. Тетрады микроспор:
a — в пыльнике ржи; *b* — в пыльнике гречихи (микротомные препараты).

ментами в конце периода образования тетрад. На этом заканчивается второе деление мейоза и переход от спорофита к гаметофиту.

Тетрады микроспор разных видов растений имеют неодинаковый внешний вид. У ржи, пшеницы, лилии все микроспоры тетрады расположены в одной плоскости, так как оси фигур делящихся клеток во втором делении ориентированы параллельно. Форма каждой микроспоры напоминает сектор круга (рис. 78, а). Это так называемый *изобиллатеральный* тип тетрад.

У гречихи, вики клетки тетрады расположены в разных плоскостях, так как фигуры делящихся клеток во втором делении перпендикулярны друг другу. Этот тип расположения тетрад называют *тетраэдрическим* (рис. 78, б).

При анализе мейоза учитывают время заложения клеточной перегородки. У однодольных растений чаще встречается *сукцессивный* (последовательный) тип образования тетрад, когда перегородки в телофазе закладываются как в первом, так и во втором делениях мейоза. Интеркинез при этом может быть длительным. У двудольных растений чаще (но не всегда) наблюдается *симультаный* (одновременный) тип образования тетрад — когда четыре клетки возникают сразу после завершения двух делений мейоза. Интеркинез при этом сокращен. Встречается, хотя и редко, промежуточный тип образования тетрад микроспор, при котором перегородка после первого деления мейоза закладывается не полностью и последующее развитие протекает по симультанному типу.

Изучение микроспорогенеза в пыльниках на давленных препаратах

Молодые колосья пшеницы до выколашивания (когда до выхода колоса из листового влагалища остается около 3 см) или бутончики других культур фиксируют по Карнуа или уксусным алкоголем в течение 10—12 ч. Материал промывают и хранят в 70—80%-м растворе этилового спирта или оставляют в фиксаторе, но помещают его в холодильник. Можно использовать для тех же целей фиксатор Ньюкомера. В этом случае фиксированный материал через сутки нужно перенести в свежий фиксатор и хранить в холодильнике.

Пинцетом извлекают пыльники из цветков и помещают их на предметное стекло. Свежий или зафиксированный пыльник дробят на мелкие кусочки или готовят мазок при помощи пинцета. Содержимое пыльника окрашивают ацетокармином с подогревом препарата на спиртовке. Нередко зафиксированные пыльники до окрашивания выдерживают около 30 мин в 4%-м растворе железоммонийных квасцов, промывают водой и помещают в тигель с ацетокармином и переносят на сутки в термостат.

Хорошие результаты получают при окрашивании пыльников по Фельгену. Для этого зафиксированные пыльники промывают водой, затем споласкивают 1 н. раствором HCl и помещают на гидролиз в 50%-й раствора HCl на 20 мин, а затем в реактив Шиффа на 1—2 ч. Просмотр содержимого пыльников на предметном стекле ведут в капле 45%-го раствора уксусной кислоты. Удачный препарат окантовывают парафином или переводят в постоянный. Препарат после окраски можно заключить в раствор Гойера: подогреть 10 мл H_2O , растворить в ней 6 г гуммиарабика, 3,2 г глицерина, 40 г хлоралгидрата.

Для подсчета числа хромосом можно использовать метафазу первого деления мейоза, когда хорошо видны биваленты хромосом. Например, у кукурузы обнаруживается 10 бивалентов. Для определения $2n$ число бивалентов умножают на 2.

Мазки пыльников можно окрашивать кристаллическим фиолетовым в такой последовательности.

1. При помощи скальпеля или пинцета делают мазок пыльника на предметном стекле.

2. Фиксируют мазок в фиксаторе (3:1), который наливают в чашку Петри. На дно чашки кладут две спички, а на них — предметное стекло мазком вниз на 10—20 мин.

3. Промывают препарат в воде.

4. Помещают препарат в 1%-й раствор кристаллического фиолетового на 15 мин.

5. Промывают препарат в воде.

6. Помещают препарат в 1%-й раствор йода в 2%-м водном растворе йодида калия.

7. Промывают водой и обезвоживают в крепких растворах этилового спирта перед заключением в бальзам.

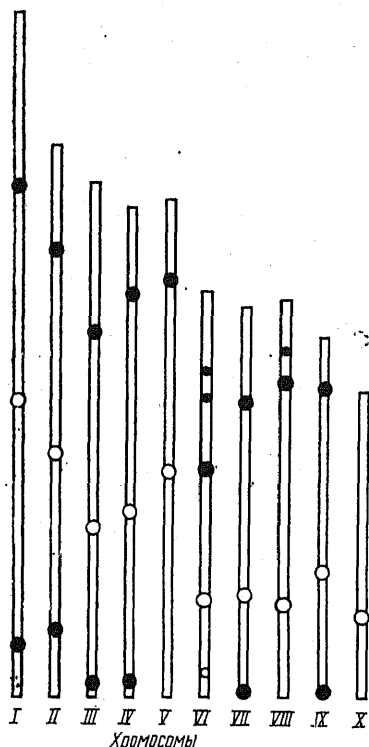
В результате хромосомы приобретают темно-фиолетовую окраску. Начиная с пункта 4, этот метод можно использовать и для микротомных препаратов.

Пахитенный анализ

У кукурузы, ржи и других растений на стадии пахитены в мейозе можно изучить морфологические признаки каждой пары конъюгирующих хромосом: относительную длину каждой из них, соотношение длинных и коротких плеч, характерную особенность хромомер, расположение центромер (рис. 79), число и величину узелков — knobов (англ. knob — выпуклость, шишка). Размер последних у кукурузы 0,33—3,3 мкм. Узелок состоит из гетерохроматина.

Некоторые из перечисленных признаков хромосом можно использовать как цитологические маркеры. Установлена связь между числом узелков и географическим происхождением сортов.

Рис. 79. Схема расположения узелков и центромер в хромосомах кукурузы. По Лонгли.



Приводим методику приготовления препаратов для пахитенного анализа кукурузы в той последовательности, которую использовали в Институте цитологии и генетики Сибирского отделения АН СССР.

1. Метелку кукурузы за 10 дней до выметывания, когда колоски имеют длину 4—5 мм, а пыльники 2—3 мм, отрезают и опускают в пары аммиака на 3—5 мин, а затем в фиксатор Карнуа или в смесь этилового спирта и пропионовой кислоты (3:1) на 8—24 ч.

2. Метелку из фиксатора переносят последовательно в три сосуда с 70%-м раствором этилового спирта для промывания и оставляют на хранение в таком же растворе.

3. Берут несколько пыльников, помещают на предметное стекло и измельчают их препаровальной иглой в капле ацетокармина.

4. Убирают остатки тканей пыльника и просматривают препарат под микроскопом с малым увеличением без покровного стекла. Если найдена нужная фаза, препарат накрывают покровным стеклом и несколько раз подогревают на спиртовке с добавлением ацетокармина.

5. На препарат наносят две капли 45%-го раствора уксусной кислоты с двух сторон покровного стекла. Излишки ее убирают фильтровальной бумагой.

6. Препарат переворачивают покровным стеклом вниз и кладут на ровную поверхность стекла с фильтровальной бумагой, а затем давят на препарат большим пальцем.

7. Препарат окантовывают парафином и изучают под микроскопом с иммерсионным объектом. Изготавливают рисунок при помощи рисовального аппарата.

РАЗВИТИЕ МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА [МИКРОГАМЕТОГЕНЕЗ]

Высвобождающиеся из тетрад микроспоры окружены плазмалеммой и тонкой экзиной. Они увеличиваются в размере и вакуолизируются. В период вакуолизации синтезируются *интина* и внутренний слой *экзины*. Термины *экзина* и *интина* введены в 1833 г. Ю. Фришше. Наружная скульптурированная часть *экзины* (*сэкзина*) прикрепляется к внутренней (*нэкзине*) с помощью *бакул*-стерженьков, которые могут оставаться свободными или объединяться в *тектум*-покров. Иногда *экзина* образует однородный футляр. Следует отметить, что в клеточной селекции одноядерные пыльцевые зерна используют для получения гаплоидов в культуре клеток (*in vitro*).

В ходе дальнейшего развития гаплоидное ядро пыльцевого зерна перемещается ближе к оболочке и вступает в первый митоз, завершающийся образованием двух гаплоидных клеток: *вегетативной* (крупной, вакуолизированной) и *генеративной* (небольшой, с плотным ядром). Интервал между временем, когда микроспоры еще собраны в тетрады, и первым митозом составляет несколько дней (у кукурузы пять дней). Ядро вегетативной клетки контролирует функционирование пыльцевого зерна и пыльцевой трубки. У многих растений пыльцевые зерна содержат только вегетативную (богатую запасными веществами) и генеративную клетки, а спермии образуются после второго митоза генеративного ядра в пыльцевой трубке, т. е. после прорастания пыльцевого зерна на рыльце пестика.

В семействах мятликовые, астровые, льновые, гречишные генеративное ядро вступает во второй митоз в пыльцевом зерне, и в результате образуется два гаплоидных спермия, представляющих собой редуцированные клетки (рис. 80, А). В этом случае зрелые пыльцевые зерна содержат вегетативное ядро и два спермия. Спермии обуславливают оплодотворяющую способность свежих пыльцевых зерен, что используется как своеобразный тест фертильности в практической селекции при оценке пыльцы перед скрещиванием растений. Таким образом, мужские гаметы растений (спермии) образуются не сразу после завершения мейоза, а по завершении двух митотических делений гаплоидных микроспор.

Для спермиев характерно наличие компактного хроматина и отсутствие ядрышек. Форма и величина спермиев неодинаковы у различных видов растений. Спермии ржи имеют вытянутую форму. У других культур встречается шаровидная и иная форма.

Итак, зрелое пыльцевое зерно представляет собой мужской гаметофит (рис. 80, Б). Основные признаки, учитываемые при характеристике пыльцевых зерен, — число борозд, форма и расположение апертур, наличие выростов на *экзине* или их отсутст-

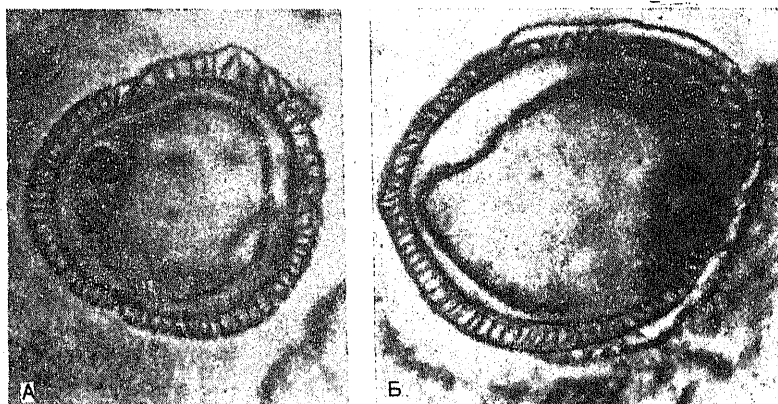


Рис. 80. Пыльцевые зерна гречихи культурной:

А — одноядерное; Б — зрелое.

вие. Различают однобороздные (однодолные растения) и трехбороздные (двудольные) пыльцевые зерна; иногда борозд нет совсем. Наличие борозд дает возможность пыльцевым зернам изменять свой объем при колебаниях влажности воздуха.

На поверхности пыльцевых зерен имеются апертур — места возможного прорастания пыльцевых трубок. Они располагаются в бороздах или участках утолщенной оболочки. При отсутствии борозд их роль выполняют округлые тонкие участки — поры.

Растения семейства мятликовые имеют округлые, гладкие пыльцевые зерна с одной порой. У пшеницы такая пора прикрыта крышечкой.

Пыльцевые зерна различных сельскохозяйственных культур варьируют по числу борозд, апертур или пор, структуре и толщине экзины, величине, форме и числу клеток в них. У ветроопыляемой культуры — кукурузы — они крупные (около 100 мкм), округлой формы, с одной порой, гладкой, тонкой экзиной, содержат вегетативное ядро и два спермия. Пыльцевые зерна насекомоопыляемой культуры — подсолнечника — намного мельче, с тремя порами, на поверхности экзины несут шипики, имеют вегетативное ядро и спермии. У картофеля пыльцевые зерна двухъядерные, бороздно-поровые, с гладкой экзиной. У сахарной свеклы они также двухъядерные, но многопоровые, у бобовых культур — двухъядерные, с тремя порами.

Подсчет хромосом в пыльцевых зернах во время гаплоидного митоза

В Главном ботаническом саду АН СССР в работе с отдаленными гибридами злаковых культур используют методику подсчета хромосом во время первых митозов в пыльцевых зернах. Это очень

важно при отборе необходимого селекционного материала на корню.

Пыльники пшеницы анализируют с утра до 12 ч дня. Выбирают растения, у которых колос почти полностью вышел наружу из листового влагалища. Свежий пыльник помещают на предметное стекло. Лево́й рукой придерживают его препаровальной иглой, а правой режут на мелкие доли при помощи бритвенного лезвия. Добавляют 2 капли ацетокармина, приготовленного по Сноу (см. с. 98), подогревают препарат на спиртовке и оставляют стоять для прокрашивания, затем просматривают под микроскопом.

Во Всесоюзном НИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова применяют оригинальную методику выдавливания содержимого пыльника. Пыльник помещают на предметное стекло в каплю ацетокармина, отрезают у него один конец лезвием бритвы. Придерживая пыльник пинцетом, проводят иглой от пинцета к отрезанному концу пыльника, выдавливая его содержимое.

Для наблюдения митозов в пыльцевых зернах хлопчатника и свеклы необходимо сделать пыльцу прозрачной. Этого достигают при помощи предварительной обработки пыльцы. После фиксации по Ньюкомеру или в уксусном спирте пыльники сохраняют в 70%-м растворе этилового спирта. В момент приготовления препарата их сначала обрабатывают свежим раствором, состоящим из 15% CrO_3 + 10% HNO_3 + 5% HCl (1:1:1), 10 мин. Затем жидкость оттягивают фильтровальной бумагой, наносят каплями воду для промывания и оттягивают ее. Потом окрашивают ацетокармином (без подогрева) и изучают препарат.

Наблюдать за состоянием ядер в пыльцевых зернах прижизненно можно, поместив свежую пыльцу злаков в 5—10%-й раствор сахарозы. На светлом или, лучше, темном поле (см. с. 39) под микроскопом можно увидеть тетрады микроспор, одноядерные пыльцевые зерна, первый митоз, генеративную клетку и вегетативное ядро.

Приготовление глицериножелатиновых препаратов для измерения и изучения структуры пыльцевых зерен

При работе с пыльцевыми зернами часто используют глицериножелатиновые препараты, которые долго сохраняются. Согласно Ноксу препараты готовят с использованием жидкости Кэлберла. В ее состав входят 5 мл глицерина, 10 мл 95%-го раствора этилового или метилового спирта, 15 мл дистиллированной воды, три капли насыщенного раствора основного фуксина в воде, три капли расплавленного глицериножелатина. Эту жидкость наносят на предметное стекло, стряхивают в нее пыльцевые зерна и накрывают покровным стеклом. В результате экина окрашивается в красный цвет.

Фертильность пыльцевых зерен

Принято различать *жизнеспособность* и *оплодотворяющую способность* пыльцевых зерен. По определению Уолдена и Эверетта, жизнеспособность пыльцевых зерен — это способность мужского гаметофита к росту на соответствующих тканях пестика, а оплодотворяющая способность, или зиготический потенциал, пыльцевого зерна — способность его вызывать полное оплодотворение. Оплодотворяющую способность пыльцевых зерен еще называют *фертильностью*. Наиболее надежное определение жизнеспособности и фертильности дают методы *in vivo*. Для сравнительных оценок можно применять и те из них, которые основаны на реакциях окрашивания. Для определения фертильности пыльцевых зерен используют два метода: ацетокарминовый и йодный.

Ацетокарминовый метод. Фиксируют соцветия со зрелой пылью в фиксаторе Карнуа. Продолжительность фиксации колеблется от 30 мин до нескольких часов. Материал промывают и хранят в 80%-м растворе этилового спирта. После хранения пыльник выкладывают на предметное стекло и раздавливают в капле ацетокармина. Убрав лишние ткани, препарат накрывают покровным стеклом и осторожно подогревают на спиртовке.

Можно определить фертильность пыльцы ацетокарминовым методом без предварительной фиксации, т. е. используя свежие пыльники. Нередко материал фиксируют в уксусном спирте (3:1), а затем пыльцевые зерна сразу окрашивают ацетокармином.

У фертильных пыльцевых зерен зернистая цитоплазма и спермии окрашены в густой карминово-красный цвет. Стерильные пыльцевые зерна почти не окрашиваются ацетокармином или окраска неравномерна. Их содержимое часто отходит от оболочки.

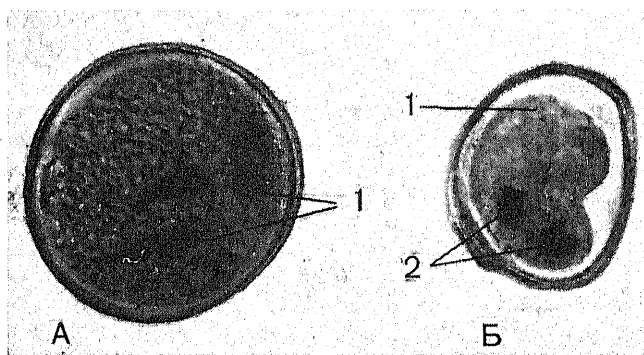


Рис. 81. Пыльцевые зерна пшеницы после окраски ацетокармином:

А — фертильное; 1 — спермии; Б — стерильное пыльцевое зерно; 1 — содержимое пыльцевого зерна отошло от оболочки; 2 — погибающие вегетативное и генеративное ядра.

ки и находится на разных стадиях отмирания. Спермиев в таких пыльцевых зернах нет (рис. 81).

Результаты исследования пыльцевых зерен заносят в таблицу:

Объект исследования	Номер поля зрения	Число пыльцевых зерен	
		фертильных	стерильных

Указанные различия между фертильными и стерильными пыльцевыми зернами нетрудно установить, если пыльца имеет тонкую экзину. Толстая экзина маскирует содержимое пыльцы.

У многих культурных видов растений спермии образуются не в пыльце, а в пыльцевых трубках во время их прорастания в столбике. В таких случаях о фертильности пыльцевых зерен приходится судить относительно — по окрашиванию их содержимого.

При проведении пыльцевого анализа на фертильность учитывают, что пыльцевые зерна в одном соцветии могут быть на разных этапах развития. Так, в колосе пшеницы в одних цветках пыльцевые зерна со спермиями, а в других — они незрелые, с одним-двумя ядрами. Еще более усложняется картина при изучении отдаленных гибридов.

Кихара в 1959 г. выявил у гибрида *Triticum aestivum* × *Aegilops caudata* пять типов пыльцевых зерен: нормальные, с одним вегетативным ядром и двумя эллиптическими ядрами спермиев; почти нормальные, с одним вегетативным и двумя округлыми ядрами спермиев; двухъядерные; одноядерные; абортивные, или стерильные. Из этих пяти типов только первый обладал фертильностью.

Йодный метод. У некоторых культур, например у гречихи, пыльцевые зерна имеют толстую экзину, через которую трудно увидеть спермии при окрашивании ацетокармином. Удобнее йодный метод определения фертильности пыльцы. В основе его лежит определение крахмала при помощи йодной реакции. Фертильные и стерильные пыльцевые зерна отличаются по содержанию крахмала. Обычно фертильное пыльцевое зерно гречихи полностью заполнено крахмалом, а стерильное не имеет его совсем или содержит следы (рис. 82).

Приготовление реактива. Йодный раствор готовят по рецепту Грама: 2 г йодида калия растворяют в 5 мл дистиллированной воды при нагревании. Затем в раствор добавляют 1 г металлического йода, доводят до 300 мл и хранят в склянке из оранжевого стекла.

Зрелые пыльники вскрывают двумя иглами на предметном стекле, смачивают йодным раствором и, удалив лишние ткани,

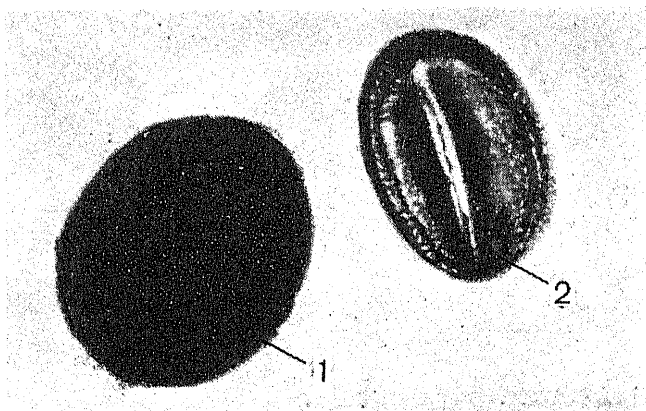


Рис. 82. Пыльцевые зерна гречихи после окраски йодом:
1 — фертильное; 2 — стерильное.

накрывают покровным стеклом. Под микроскопом можно легко отличить фертильные пыльцевые зерна по темно-фиолетовому (почти черному) цвету. Стерильные пыльцевые зерна остаются неокрашенными, так как не содержат крахмала или имеют его следы. Неокрашенными оказываются и оболочки пыльцевых зерен.

У злаков рассматривают весь пыльник целиком, чтобы не допустить ошибок в определении стерильных пыльцевых зерен, за которые по неопытности можно принять оболочки разрушенных пыльцевых зерен.

По содержанию крахмала пыльцевые зерна кукурузы делят на группы. Так, установлено, что содержание крахмала связано со степенью развития мужского гаметофита. Если формирование спермиев закончено, количество крахмала соответствует норме. Пыльцевые зерна с незавершенным развитием имеют крахмала меньше нормы. В двухклеточной пыльце присутствуют следы крахмала, а в одноядерной—или следы крахмала, или его нет совсем. Синтез крахмала в стерильном пыльцевом зерне не достигает нормы. Обнаружено также, что пыльцевые зерна, несущие спермии, не всегда фертильны, даже если в них есть крахмал (Л. И. Орел, 1967).

Методика окрашивания следующая. Пыльник кукурузы просветляют в 10%-м растворе гидроксида калия и при необходимости фиксируют в уксусном спирте (3:1). Крахмал выявляют в растворе хлоралгидрата (5 г хлоралгидрата смешивают с 2 мл воды и добавляют кристаллический йод до насыщения) или используют йодид калия с металлическим йодом (в 100 мл воды растворяют 3 г йодида калия, затем 0,2 г йода).

Предложен метод заключения пыльцевых зерен в агаре, что удобно в цитологической практике. Для этого 1 г агара растворяют в 50 мл воды и кипятят 3 мин. В агар добавляют 6 мл йодного раствора (0,3 г йода и 1 г йодида калия в 100 мл воды) и 14 мл 1 н. раствора HCl . В такой теплый раствор помещают пыльцевые зерна на предметном стекле и накрывают покровным стеклом.

Стерильность пыльцевых зерен

Стерильность пыльцевых зерен у растений возникает по разным причинам. Так, у сахарной свеклы в 1936 г. Ф. А. Абеггом была обнаружена *генная стерильность*. В этом случае контроль над признаком стерильности осуществляет рецессивный ген a , названный геном абортивности пыльцы. При опылении таких растений фертильной пыльцой, несущей доминантный ген A , все потомство получается фертильным, а от скрещивания гетерозигот Aa во втором поколении наблюдается менделевское расщепление 3:1, т. е. образуются растения с фертильной пыльцой (75%) и со стерильной (25%) без промежуточных форм. Такое расщепление обычно для признаков, контролируемых генами ядра.

В отличие от генной стерильности у растений с цитоплазматической мужской стерильностью наблюдается образование полностью стерильного потомства или полустерильных форм по пыльце.

Впервые цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) была открыта в 1904 г. Корренсом у чабера (*Satureja hortensis*). Затем ее обнаружили у льна, лука, подсолнечника, кукурузы, свеклы, сорго, пшеницы. Сейчас это явление известно примерно у 25 видов растений, относящихся к 17 родам. Наиболее детально оно изучено у кукурузы, после того как его открыли М. И. Хаджинов в СССР и Родс в США.

Цитоплазматическая мужская стерильность передается только по материнской линии и связана с особенностями цитоплазмы, причем на ее проявление оказывает влияние генотип. Так, у кукурузы встречаются растения со стерильной пыльцой от сочетания стерильной цитоплазмы ($цит^s$) и гомозиготного рецессивного генотипа $rfrf$. При сочетании нормальной цитоплазмы ($цит^N$) и гомозиготного генотипа $rfrf$, а также гетерозиготного генотипа $Rfrf$ и любой цитоплазмы растения будут иметь фертильную пыльцу. Rf — доминантный ген (англ. *restoring fertility* — восстанавливающий фертильность), rf — рецессивная аллель того же гена. Символ $цит^s$ применяют для обозначения свойств стерильной цитоплазмы. Существуют разные типы ЦМС и гены Rf .

Цитоплазматическая мужская стерильность у сахарной свеклы обусловлена взаимодействием стерильной цитоплазмы ($цит^s$) и двух рецессивных генов x и z .

В начале шестидесятых годов текущего столетия стало известно о существовании ЦМС у пшеницы, выявившейся при скрещивании *Aegilops caudata* × *Triticum aestivum*. Гибрид первого поколения от этого скрещивания имел полностью стерильную пыльцу. Источниками стерильности оказались также *Aegilops ovata*, *Triticum timopheevi*, *T. araraticum* и др. У пшеницы при оценке действия стерильной цитоплазмы необходимо учитывать взаимодействие двух пар генов — rf_1 и rf_2 . Действие стерильной цитоплазмы не проявляется, если растение имеет генотип $Rf_1Rf_1Rf_2Rf_2$ (при этом образуется фертильная пыльца). Если один из генов Rf находится в гетерозиготном или гомозиготном состоянии, то растение будет полустерильным.

Стерильная пыльца может образоваться у растений при опрыскивании их особыми химическими соединениями — *гаметоцидами* (например, этрелом). Этот процесс называют *химической кастрацией*. Развитие пыльников в данном случае останавливается, и пыльца дегенерирует.

Цитологические методы, устанавливающие стерильность пыльцы, описаны на странице 208.

Выявление жизнеспособности пыльцевых зерен

Известно несколько методов определения жизнеспособности пыльцы в лабораторных условиях. Ее можно проращивать на искусственной среде во влажной камере или определять наличие в ней ферментов, связанных с жизненными процессами. Возможен и люминесцентный анализ.

Проращивание пыльцевых зерен в камере Ван-Тигема. Камеру Ван-Тигема легко приготовить. Для этого стеклянную трубку диаметром 10—12 мм режут на кольца длиной 5—7 мм. Кольцо с отшлифованными краями приклеивают парафином в центре предметного стекла. Верхние края кольца смазывают вазелином, а внутрь него на дно наносят каплю воды. Сверху кольцо закрывают покровным стеклом, в центр которого помещена капля искусственной среды с пыльцой (рис. 83).

Для приготовления искусственной среды агар-агар заливают в колбе небольшим количеством воды для набухания, а затем

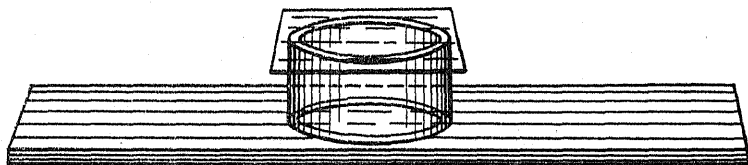


Рис. 83. Камера Ван-Тигема для проращивания пыльцевых зерен. По В. Н. Юрцеву.

колбу ставят на теплую водяную баню. Когда агар-агар растворится, добавляют сахарозу. В 100 мл готового раствора должно быть растворено 1 г агар-агара и 5—40 г сахарозы (в зависимости от объекта). Для гороха, кукурузы, картофеля и других растений используют 10—15%-й раствор сахарозы. Иногда добавляют 0,008%-й раствор борной кислоты.

На чистое покровное стекло наносят каплю горячей искусственной среды и сверху быстро сеют пыльцу, предварительно набрав ее пинцетом, который держат в левой руке. Другой рукой берут скальпель, которым слегка ударяют сверху по пинцету, чтобы пыльца сеялась равномерно. Покровное стекло переворачивают и накрывают им кольцо камеры Ван-Тигема. Пыльца оказывается внутри влажной камеры.

Камеры переносят в термостат с температурой 20—30°C. Через каждый час пыльцу нужно просматривать под микроскопом, чтобы установить начало ее прорастания. Подсчитывают прорастающие пыльцевые зерна в пяти—десяти полях зрения. Процент жизнеспособной пыльцы устанавливают по числу проросших пыльцевых зерен. Пыльцевые трубки должны иметь длину не меньшую, чем диаметр пыльцевых зерен.

Удобный объект для проращивания пыльцы в камерах Ван-Тигема — примула.

При проращивании пыльцы кукурузы можно добавлять к питательной среде свежий куриный желток. Среду готовят из растворов 1%-го агар-агара и 17%-го сахарозы. На 10 мл этой среды добавляют 1 каплю желтка. На дно камеры помещают 0,5 см² влажной фильтровальной бумаги. Проращивают пыльцу при 24—26°C.

Метод Д. А. Транковского. В качестве влажных камер для проращивания пыльцевых зерен используют бактериологические чашки с увлажненной фильтровальной бумагой или стеклянные колпаки. Искусственную среду, состоящую из 1%-го раствора агар-агара и тростникового сахара различной концентрации, наносят на предметное стекло. Сверху высевают пыльцу из зрелых пыльников. Затем предметные стекла помещают во влажную камеру. Проросшие пыльцевые зерна фиксируют по Навашину с добавлением в фиксатор тростникового сахара в такой же концентрации, как в искусственной среде, или несколько больше.

Через 2—3 мин препараты переносят в свежий фиксатор на 1—1,5 часа, затем промывают водой, протравливают железо-аммонийными квасцами, окрашивают гематоксилином по Гейдеггау, обезвоживают в спирте, заключают в ксилол и бальзам.

В. А. Поддубная-Арнольди использовала для окраски пыльцевых трубок *in vitro* ацетокармин и фиксацию по Карнуа с последующей окраской гематоксилином по Делафилду (см. с. 87) или Эрлиху.

Некоторые исследователи, чтобы изучить действие облучения на пыльцу и накопить клетки в стадии метафазы при исследовании митозов в пыльцевых трубках, добавляют в искусственную среду колхицин 0,05%-й концентрации или в чашки Петри, в которых находятся препараты с проросшей пыльцой, помещают кристаллы аценафтена. Пары аценафтена ингибируют веретено деления.

Оба рассмотренных метода проращивания пыльцы на искусственной среде во влажных камерах пригодны не для всех культур, так как могут давать заниженные результаты. Успех работы во многом определяется стерильностью посуды и растворов.

Метод В. С. Шардакова. Он основан на выявлении фермента *пероксидазы* в жизнеспособных пыльцевых зернах. Непосредственно перед исследованием готовят четыре свежих раствора, которые помещают в темную посуду:

А — 0,20 г бензидина основного растворяют в 100 мл 50%-го раствора этилового спирта;

Б — 0,15 г α -нафтола растворяют в 100 мл 50%-го раствора этилового спирта;

В — 0,25 г карбоната натрия растворяют в 100 мл дистиллированной воды;

Г — 0,3%-й раствор перекиси водорода (в капельнице).

Первые три раствора (А, Б, В) перед началом работы смешивают в равных объемах и наливают в капельницу. Пыльцу помещают на предметное стекло в каплю этой смеси и добавляют каплю перекиси водорода. В присутствии бензидина живая пыльца, содержащая пероксидазу, окрашивается в ярко-розовый или темно-красный цвет.

Погибшая пыльца не окрашивается.

Однако этот метод дает завышенные результаты при исследовании хранившейся пыльцы.

Метод П. И. Диакону. Этот метод был разработан в ТСХА. О жизнеспособности судят по наличию активных дыхательных ферментов *дегидрогеназ*, в присутствии которых бесцветный раствор 2,3,5-трифенилтетразол хлорида восстанавливается в формазан ярко-красного цвета. Погибшие пыльцевые зерна остаются бесцветными.

Необходимы следующие растворы:

1-й. $\frac{1}{15}$ М раствор $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;

2-й. $\frac{1}{15}$ М раствор KH_2PO_4 ;

3-й. Фосфатный буфер Сёрнсена (рН 7,17); для его получения соединяют 70 мл $\frac{1}{15}$ М раствора $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 30 мл $\frac{1}{15}$ М раствора KH_2PO_4 ;

4-й. 0,5—0,1%-й раствор 2,3,5-трифенилтетразол хлорида в $\frac{1}{15}$ М фосфатном буфере Сёрнсена с рН 7,17 (в качестве буфера используют 3-й раствор).

Пыльцевые зерна помещают в одну-две капли раствора 4, накрывают покровным стеклом и ставят в термостат при 37 °C на 20—30 мин. Под микроскопом просматривают пять полей зрения в каждом из 3—5 препаратов. Окрашенные в красный цвет пыльцевые зерна относят к жизнеспособным.

Метод дает четкие результаты при работе со многими сельскохозяйственными культурами.

Метод флуоресцентной микроскопии. Флуоресцин диацетат растворяют в ацетоне (10 мг в 5 мл) и две-три капли добавляют к нескольким мл 10%-го раствора сахарозы (для злаков—30%), до появления молочного оттенка. Наносят раствор сахарозы на предметное стекло, проводят посев пыльцы, накрывают покровным стеклом и изучают препарат под люминесцентным микроскопом с голубыми фильтрами в течение 10 мин. Живые пыльцевые зерна флуоресцируют. Этот метод предложили Дж. и И. Хеслоп-Харрисоны в 1970 г.

Выявление нередуцированных пыльцевых зерен

У картофеля многие диплоидные виды образуют нередуцированные гаметы ($2n$ вместо n), что используют в селекции для облегчения скрещивания их с тетраплоидными видами, последние в норме образуют диплоидные гаметы ($2n$). Анализ пыльцевых зерен у диплоидных видов картофеля выявил различие их по величине в зависимости от уровня пloidности. Гаплоидные пыльцевые зерна (n) имели размер 18—23 мкм, а диплоидные ($2n$) — 26—33 мкм.

Для анализа пылью вытряхивают из пыльников на предметное стекло, окрашивают ацетокармином или йодом, измеряют под микроскопом для выявления отличий в размере гаплоидных и диплоидных пыльцевых зерен, а затем отбирают растения с учетом анализа.

МЕГАСПОРОГЕНЕЗ

Процесс образования мегаспор (макроспор) в семязпочках растений называется *мегаспорогенез*, или *макроспорогенез*. У цветковых растений совокупность всех пестиков цветка принято называть *гинецеем*. У наиболее простого гинецея, состоящего из одного пестика, внутри завязи располагается одна (пшеница, рожь, ячмень, овес, кукуруза, гречиха) или несколько (горох, фасоль, клевер) семязпочек. Соответственно после оплодотворения из них развивается одно или несколько семян. Строение пестика рассматривают при малом увеличении микроскопа на постоянных препаратах, окрашенных по Делафилдзу или Фёльгену. В качестве объектов хорошо использовать продольные срезы пестиков указанных выше сельскохозяйственных культур.

В семязпочке (рис. 84) различают *интегументы* (покровы) и *нуцеллус* (центральный часть). Интегументы (один или два) не срастаются и образуют *пыльцевход* (*микропиле*), через которые пыльцевые трубки проникают внутрь семязпочки. Противоположная часть семязпочки называется *халазой*. У злаковых семязпочки сидячие, т. е. не имеют *семязножки* (*фуникулуса*). У бобовых семязпочки имеют семязножку.

Степень развития нуцеллуса семязпочки и глубина, на которой закладывается археспорий, неодинаковы у различных видов растений. Различают *красинуцеллятные* семязпочки с хорошо развитым многоклеточным нуцеллусом и *тенуинуцеллятные* — со слабо развитым нуцеллусом, часто состоящим всего из одного-двух слоев клеток. На препаратах можно сравнить семязпочки различных сельскохозяйственных культур. Так, у пшеницы они красинуцеллятные с двумя покровами, а у подсолнечника — тенуинуцеллятная семязпочка с одним покровом.

Положение семязпочек в завязи не всегда остается неизменным. На продольном срезе пестика гречихи видно, что микропиле семязпочки находится непосредственно под столбиком пестика, т. е. в верхней части завязи. Такая семязпочка называется *пря-*

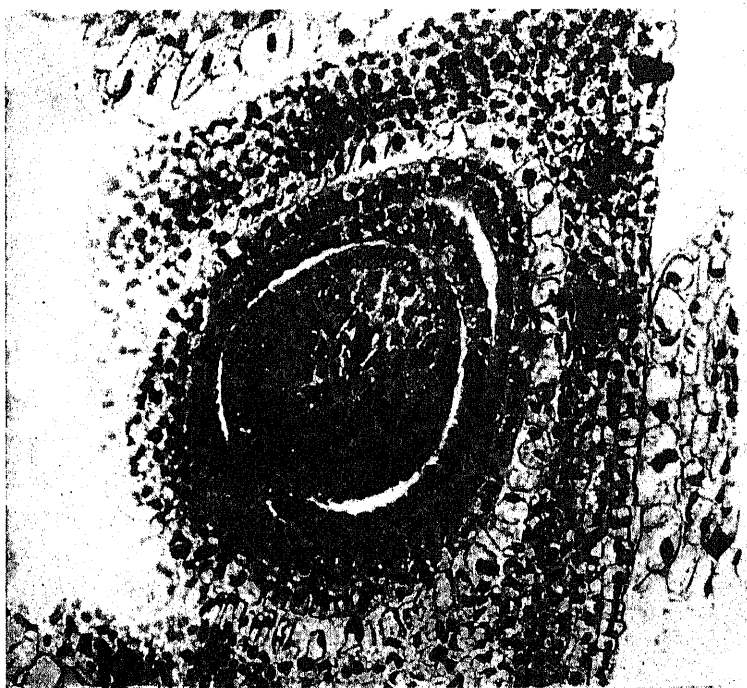


Рис. 84. Семязпочка гречихи (микротомный препарат).

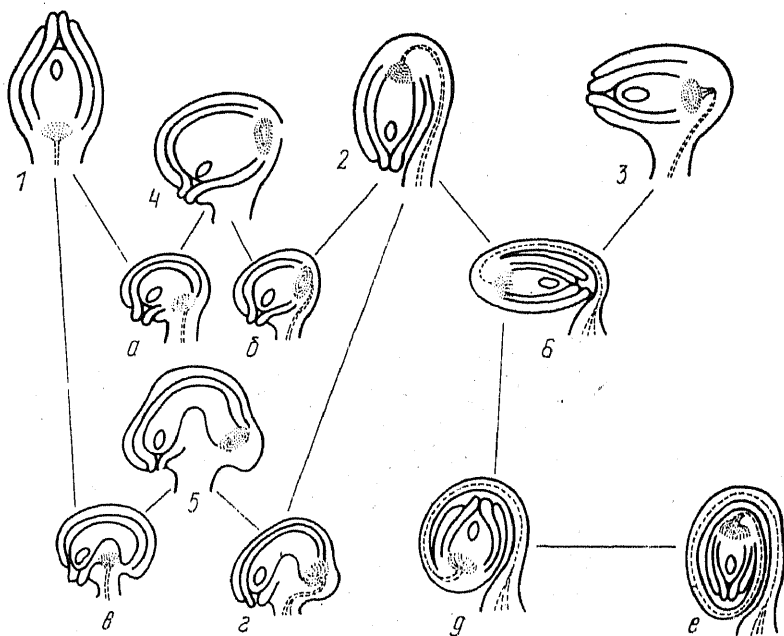


Рис. 85. Типы семязпочек и связи между ними.

Основные типы: 1 — ортотропная, или атропная; 2 — анатропная; 3 — гемитропная; 4 — кампилотропная; 5 — амфитропная; 6 — гипертропная; производные, или переходные: а — орто-кампилотропная; б — ана-кампилотропная; в — орто-амфитропная; г — ана-амфитропная; д — орто-цирцинотропная; е — ана-цирцинотропная. По В. А. Поддубной-Арнольди.

мой, или *атропной*, и она сохраняет свое первоначальное положение до оплодотворения. Однако у многих видов растений закладывается прямая семязпочка, а в процессе развития в результате неравномерного роста она меняет свое положение и нередко оказывается перевернутой. При этом микропиле семязпочки смещается иногда на 180° от своего первоначального положения. Такая семязпочка называется *обратной*, или *анатропной*. Разные типы семязпочек даны на рисунке 85.

Отличительная особенность семязпочек некоторых растений, например гречихи, томата, — образование *гипостазы* в базальной части. На рисунке 86 видно, что гипостаза имеет чашевидную структуру и состоит из трех слоев клеток. В верхней части она вплотную подходит к халазе, а в нижней в непосредственной близости к ней лежит проводящий пучок. Клетки гипостазы по сравнению с клетками халазы крупные, с толстыми оболочками. Их морфология указывает на то, что они могут быть вместилищами веществ, необходимых для семязпочки.

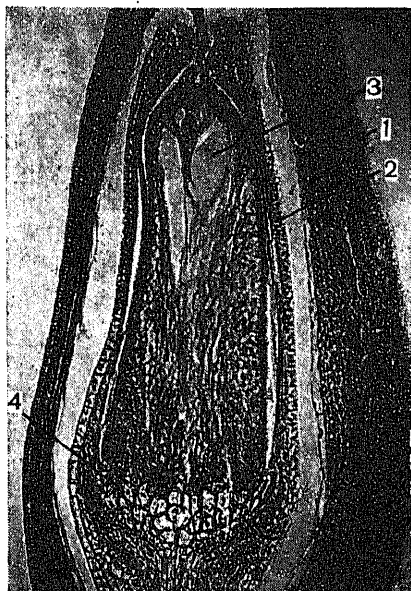


Рис. 86. Гипостаза в семязпочке гречихи:

1 — завязь; 2 — семязпочка; 3 — зародышевый мешок; 4 — гипостаза.

Некоторые ученые предполагают, что гипостаза действует как физический прибор для подсасывания питательных соков и воды. Другие считали, что это секреторная ткань, выделяющая гормоны или ферменты для роста зародышевого мешка. Используя цитохимический метод исследования, Н. В. Цингер в 1958 г. показала, что гипостаза представляет собой орган высокой физиологической активности, который принимает участие в передвижении веществ из материнского растения в зародышевый мешок.

По ее мнению, гипостаза, халаза и антиподы образуют вместе единый комплекс с гаусториальными функциями. Этот комплекс обеспечивает активное подтягивание питательных веществ.

Одноклеточный (реже многоклеточный) археспорий закладывается в той части семязпочки, которая ближе к микропиле. Археспориальная клетка отличается от других клеток нуцеллуса большей величиной, крупным ядром и ядрышком, густой цитоплазмой.

Сразу или через несколько делений археспориальная клетка становится *материнской клеткой мегаспор*, иначе *мега- или макроспороцитом* (рис. 87), и вступает в мейоз. По времени мейоз в материнской клетке мегаспор не совпадает с мейозом в пыльниках и обычно протекает позднее.

После первого деления мейоза образуются две гаплоидные клетки, называемые *диадой*. У пшеницы клетки диады разделены хорошо заметной перегородкой. Второе деление мейоза приводит к образованию *тетрады* мегаспор, которые в отличие от тетрады микроспор располагаются линейно (рис. 88), реже Т-образно. Из четырех гаплоидных мегаспор развивается только одна, обычно нижняя, она становится *материнской клеткой зародышевого мешка*.

Остальные три прекращают развитие и дегенерируют.

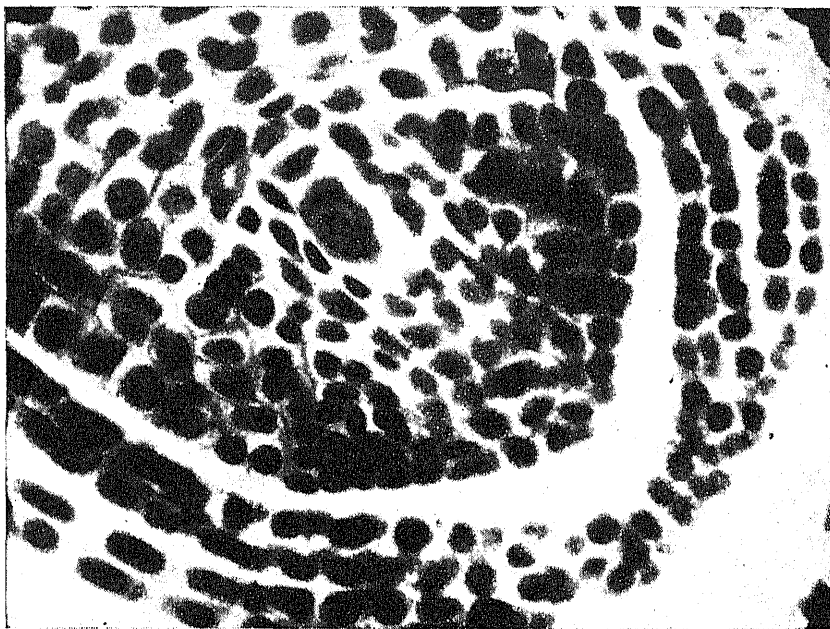


Рис. 87. Материнская клетка мегаспор — мегаспороцит в семяпочке пшеницы (микротомный препарат).

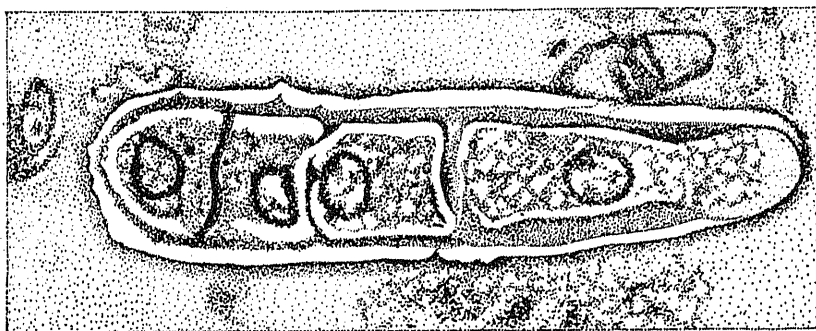


Рис. 88. Тетрады мегаспор фукусии. По Rodkiewicz.

РАЗВИТИЕ ЗАРОДЫШЕВОГО МЕШКА [МАКРОГАМЕТОГЕНЕЗ]

Наиболее распространен зародышевый мешок нормального или Polygonum-типа. Он развивается из нижней гаплоидной мегаспоры путем трех последовательных митотических делений. После

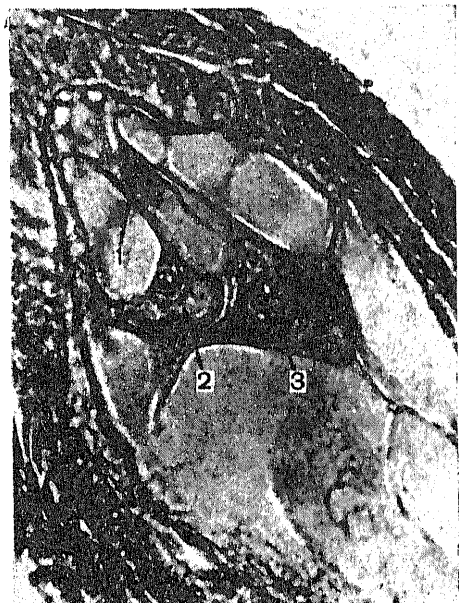


Рис. 89. Зародышевые мешки в семяпочке пшеницы:

а — двухъядерный: 1 и 2 — ядра зародышевого мешка; 3 — вакуоль; *б* — четырехъядерный: 1 — ядра зародышевого мешка; 2 — вакуоль (микротомные препараты).

Рис. 90. Микропиллярная часть зародышевого мешка гречихи:

1 — синергиды; 2 — яйцеклетка; 3 — центральное ядро (микротомный препарат).



первого деления образуется двухъядерный зародышевый мешок, в котором одно ядро от другого отделяет крупная вакуоль (рис. 89, а). Клеточная перегородка в этом случае не возникает. После второго деления ядер образуется четырехъядерный зародышевый мешок (рис. 89, б), после третьего деления — восьмиъядерный. По окончании деления на каждом полюсе зародышевого мешка оказывается по четыре гаплоидных ядра, а в центре — вакуоль. Общие размеры зародышевого мешка увеличиваются,

и в нем происходит дифференциация: формируются яйцевой и антиподаальный аппараты и центральная клетка. Обычно на микропиллярном конце семязачатка (рис. 90) располагается яйцеклетка с двумя синергидами (яйцевой аппарат). Ядро в яйцеклетке находится в нижней части, вакуоль — в верхней. Для яйцеклетки характерны поляриность и увеличенное содержание цитоплазмы. В синергидах ядра сосредоточены в верхней части, вакуоли —

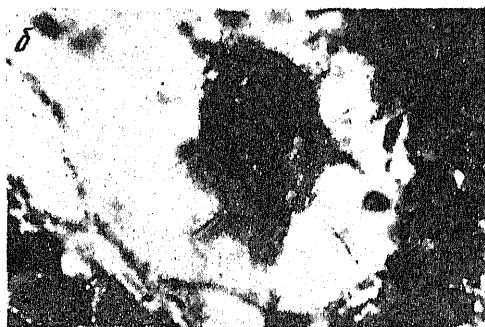


Рис. 91. Яйцеклетка (а) и центральная клетка (б) гречихи (микротомный препарат).



Рис. 92. Зародышевый мешок подсолнечника (*Helianthus annuus*):

1 — центральное ядро; 2 — яйцеклетка; 3 — синергиды; 4 — интегументальный танетум (микротомный препарат).

в нижней. Яйцеклетка — это женская гамета; ее морфология показана на рисунке 91. Функция синергид заключается в привлечении пыльцевых трубок и растворении их оболочек.

Три антиподальные клетки располагаются на противоположном конце зародышевого мешка. Зерновые культуры (пшеница, рожь, кукуруза) часто содержат более трех антипод. Политенные хромосомы были открыты именно в этих клетках. При участии антиподального комплекса в зародышевый мешок поступают питательные вещества.

Под яйцевым аппаратом располагаются два полярных ядра, которые или объединяются в одно, как у подсолнечника (рис. 92), гречихи (см. рис. 91), образуя одну диплоидную центральную клетку (вторичное ядро), или не сливаются до оплодотворения, как у пшеницы.

Таким образом, в отличие от развития мужского гаметофита при образовании нормального зародышевого мешка лишь одна из четырех мегаспор претерпевает три митотических деления. Нормальный тип зародышевого мешка характерен для большинства покрытосеменных. В зависимости от числа макроспор, участвующих в образовании зародышевого мешка, различают моноспорические — *Polygonum*-тип, биоспорические — *Allium*-тип и 10 типов тетраспорических. При определении типа зародышевого мешка учитывают и число митозов.

Методика определения фертильных и стерильных семяпочек с использованием флуоресцентной микроскопии

Для определения фертильных и стерильных семяпочек при исследовании завязей цветков люцерны до опыления во ВНИИР используют ультрафиолетовые лучи и микроскоп «Люмам». Фиксатором служит уксусный алкоголь (3:1), после которого завязи промывают 96%-м раствором спирта три раза и хранят в 70%-м его растворе. Ткани мацерируют в тигле концентрированной щелочью, доводя раствор до кипения несколько раз. После охлаждения завязи дважды промывают водой на часовом стекле, отсасывая воду пипеткой. Затем в часовое стекло наливают анилиновый синий.

Приготовление красителя. Готовят раствор 0,15 М K_2HPO_4 с pH 8, в который понемногу добавляют краситель, перемешивая его и доводя до сине-фиолетового цвета. В этот раствор добавляют нашатырный спирт (10%-й) 5 мл на 100 мл раствора и ставят в холодильник. За две недели до работы берут немного раствора красителя и оставляют на свету при комнатной температуре. pH раствора должно быть около 11. Маточный раствор можно разбавить.

При наблюдении в ультрафиолетовых лучах наблюдается яркое свечение клеток нуцеллуса стерильных семяпочек, не содержащих зародышевых мешков. Фертильные семяпочки не дают флуоресценции. Стерильные семяпочки выявляются благодаря свечению каллозы в оболочках нуцеллуса. При отсутствии микроскопов «Люмам» для работы берут светофильтры УФС-6 толщиной 3 и 5 мм, запирающие фильтры ЖС-3, осветитель ОИ-18 и используют обычный микроскоп.

Изготовление тотальных препаратов семяпочек и зародышевых мешков

Во время исследования процессов микроспорогенеза, прорастания пыльцевых трубок очень важно получить возможность изучать семяпочки и зародышевые мешки без микротомной техники.

Исследование семяпочек. В. А. Поддубная-Арнольди использовала ацетокарминовый метод для исследования целых семяпочек, не проводя их срезов. Из завязи извлекали семяпочки и помещали их в смесь ацетокармина и глицерина (1:1), после этого смесь с объектом подогревали. Работая с орхидными, В. А. Поддубная-Арнольди фиксировала целые семяпочки по Карнуа и без применения микротомной методики окрашивала объекты либо гематоксилином Эрлиха, либо по Фельгену. Последняя окраска оказалась лучше. После нее семяпочки обезживали в спирте, а затем переносили в ксилит и бальзам.

У тех же объектов все фазы развития семяпочек, начиная от заложения археспориальных клеток, можно наблюдать без всякой фиксации, т. е. на живом материале. Для этого целые семяпочки погружают в 1—10%-й раствор сахара, накрывают покровным стеклом и изучают под микроскопом с иммерсионным объективом.

Во ВНИИР некоторые исследования по развитию семяпочек проводят следующим образом: семяпочки обрабатывают для просветления 10%-м раствором КОН в 70%-м растворе спирта и заключают в глицерин или глицериножелатин.

Исследование зародышевых мешков. В 1972 г. Н. Х. Екалеева вместе с другими учеными предложила выделять зародышевые мешки путем мацерации тканей семяпочек ферментами. Можно использовать цитазу, извлекаемую из виноградной улитки.

По методике М. П. Солнцевой, В. П. Левковского в качестве фиксатора используют смесь, состоящую из 5 мл формалина, 90 мл 50%-го раствора этилового спирта и 5 мл ледяной уксусной кислоты.

Продолжительность фиксации 24 ч (возможно хранение материала в фиксаторе 1—3 мес).

Последовательность работы следующая.

1. Промывание материала дистиллированной водой 4—5 ч.
2. Гидролиз в 1 н. растворе HCl—1 ч, в 5 н. — 1,5 ч и в 1 н. — 1 ч.
3. Обработка реактивом Шиффа 16—17 ч.
4. Промывание материала сернистыми водами последовательно в трех сосудах (1, 2, 3) по 30 мин.
5. Промывание водопроводной водой 3 ч.
6. Подкрашивание гематоксилином или другим красителем.
7. Промывание в воде 1—2 ч.

8. Выделение завязей из цветков препаровальными иглами и мацерация в цитазе 17—18 ч при комнатной температуре.

9. Выделение зародышевых мешков из семяпочек путем раздвигания покровов семяпочки и выдавливания их из нуцеллуса. Лучше это делать под микроскопами МБС-1 или МБС-9.

10. Перенос зародышевых мешков капилляром на фильтровальную бумагу на предметном столе.

11. Обезвоживание зародышевых мешков путем проводки через растворы спирта 50, 70, 96 и 100%-й концентрации (по 10 мин) и оттягивания их сухой фильтровальной бумагой с другой стороны стекла.

12. Аналогично проводят препарат через ксилол.

13. Заключение в бальзам. Тупой препаровальной иглой с густой каплей бальзама переносят зародышевые мешки на другое предметное стекло с бальзамом. Накрывают покровным стеклом и подсушивают в термостате не менее суток.

Эта методика избавляет от сложной процедуры получения микротомных срезов и сокращает время приготовления препаратов.

НАРУШЕНИЯ НОРМАЛЬНОГО ХОДА МЕЙОЗА И ГАМЕТОГЕНЕЗА

Селекционеры при создании исходного материала используют химические и физические мутагены, отдаленную гибридизацию, полиплоидию, скрещивание тетраплоидов и диплоидов. В первом поколении у растений, обработанных мутагенами, и у отдаленных гибридов во время цветения обнаруживается значительное количество стерильной пыльцы и семяпочек, что приводит к снижению количества завязавшихся семян или к полному бесплодию. Причину снижения плодовитости и стерильности пыльцы можно найти при изучении процесса мейоза у этих растений.

У межсортовых (внутривидовых) гибридов мейоз обычно протекает нормально, так как родительские формы относятся к одному виду и их гаметы имеют одинаковое число гомологичных хромосом, способных к конъюгации, т. е. к образованию бивалентов. Иное дело при отдаленной гибридизации. Число хромосом у родительских форм при этом может не совпадать, а если оно и совпадает, то может отсутствовать конъюгация в профазе I. В результате вместо бивалентов или наряду с ними образуются униваленты. Иногда биваленты формируются, но не расходятся в первом делении мейоза. В таком случае может образоваться реституционное (лат. *restitutio* — восстановление) ядро с диплоидным числом хромосом и сформируются две диплоидные микроспоры.

Часто расхождение хромосом в анафазе протекает асинхронно (неодновременно), беспорядочно, хромосомы обнаруживаются на пути к полюсам вдоль всего веретена. Некоторые из них не

доходят до полюсов, остаются в цитоплазме и образуют микроядра. После этого возникают тетрады микроспор с микроядрами или пентады, гексады микроспор, многоядерные пыльцевые зерна и т. д. Пыльцевые зерна оказываются неоднородными по величине и по способности к оплодотворению, гаметы несут разное число хромосом.

Нарушение нормального хода мейоза и образование стерильной пыльцы можно проследить у отдаленных гибридов, амфидиплоидов, триплоидов, гаплоидов, мутантов, анеуплоидов и др. Продемонстрируем это на работах, выполненных впервые в ТСХА. А. Г. Николаева в 1924 г. изучала ржано-пшеничные гибриды. В соматических клетках первого поколения этих гибридов было обнаружено 28 хромосом (21+7).

Отдельно изучали мейоз на микротомных препаратах у родительских форм и гибридов. В диакинезе биваленты ржи отличались от бивалентов пшеницы тем, что имели вид длинных, часто перекрученных хромосом. У пшеницы диакинетические пары были более короткие. У чистых видов весь набор хромосом в диакинезе состоял из бивалентов. У гибридов первого поколения конъюгировали только четыре пары хромосом, а все другие оставались унивалентами. Общий вид первого деления мейоза отличался беспорядочным распределением хромосом в анафазе I (рис. 93), отсутствием нормального веретена, выхо-



Рис. 93. Мейотическое деление у ржано-пшеничного гибрида:

1 — метафаза I у ржано-пшеничного гибрида второго поколения; 2 — то же, у ржано-пшеничного гибрида первого поколения; 3, 4, 5 — веретено первого деления у ржано-пшеничного гибрида, ржи и пшеницы (соответственно); 6 — метафазная пластинка у ржано-пшеничного гибрида второго поколения; 7 — телофаза II у такого же гибрида (рисунок с микротомных препаратов). По А. Г. Николаевой.

дом хромосом из сферы веретена. Второе деление мейоза у ржано-пшеничных гибридов проходило более нормально, чем первое, но часть хромосом не доходила до полюсов и оставалась вне ядер тетрад. Наблюдалось образование микроядер. Пыльцевые зерна также имели микроядра. В результате описанных отклонений в мейозе гибрид оказался стерильным.

Аналогичные явления в том же году наблюдал Г. Д. Карпеченко у межродовых гибридов *Raphanus sativus* × *Brassica oleracea*. В 1937 г. А. Н. Лутков отметил отклонение от нормы в прохождении мейоза у редечно-капустных тетраплоидов под действием низкой температуры и хлороформа. В результате образовывались гаметы с различным числом хромосом и более высокой степенью полиплоидизации.

Изучение мейоза и гаметогенеза у мягкой яровой пшеницы Цезиум III после облучения семян лучами Рентгена в различных дозах проводила в 1941 г. А. С. Афанасьева. При высоких дозах облучения пшеницы (16 000 Р) в метафазе I наблюдалось расположение всех бивалентов в нормальную экваториальную пластинку. В анафазе I правильное распределение хромосом нередко нарушалось и к полюсам отходило неравное число хромосом или целые биваленты. Иногда хромосомы совсем не расходились, и формировалось реституционное ядро. В таком случае в интеркинезе после первого деления наблюдалась одна крупная одноядерная клетка вместо двух. После завершения второго деления вместо тетрады микроспор возникала диада микроспор.

Наиболее часто в анафазе I встречалось отставание на веретене бивалентов или их компонентов, образование мостов. Отставшие хромосомы, не успев включиться в одно из ядер, формировали микроядра. Подобная картина наблюдалась и в анафазе II. Тетрады имели микроядра, подобно диадам. Величина ядер в тетрадах варьировала. Диаметр одних пыльцевых зерен иногда превышал диаметр других в два раза. Размер нормальных пыльцевых зерен $34,0 \times 28,1$ мкм, а мелких — $17,7 \times 16,3$, с колебанием большего диаметра от 11,8 до 23,6 мкм. В резуль-

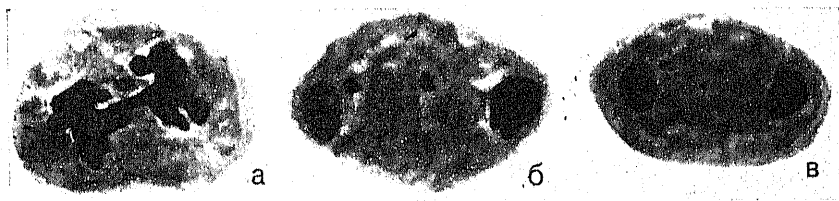


Рис. 94. Нарушения в первом делении мейоза у пшенично-пырейных гибридов после обработки мутагенами (временные препараты):

а — мост в анафазе I; б — диада с нарушениями; в — диада в норме.

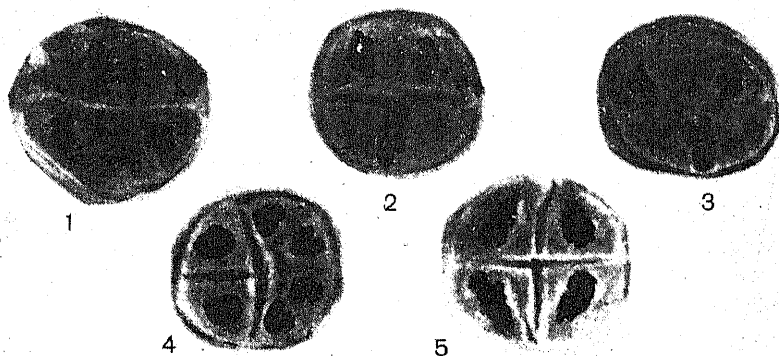


Рис. 95. Нарушения во втором делении мейоза у пшенично-пырейных гибридов после обработки мутагенами:

1—3 — асинхронное деление и слияние хромосом в метафазе; 4 — образование гексады клеток вместо тетрады; 5 — тетрады в норме.

тате образования реституционных ядер возникали диплоидные крупные пыльцевые зерна.

Нарушения в мейозе наблюдаются и при воздействии химическими мутагенами. Нарушения в мейозе у пшенично-пырейных гибридов после обработки мутагенами приведены на рисунках 94, 95. Препараты пыльников окрашивают ацетокармином и обрабатывают железоммонийными квасцами. Когда облучают молодую пыльцу, нередко нарушается деление генеративного ядра.

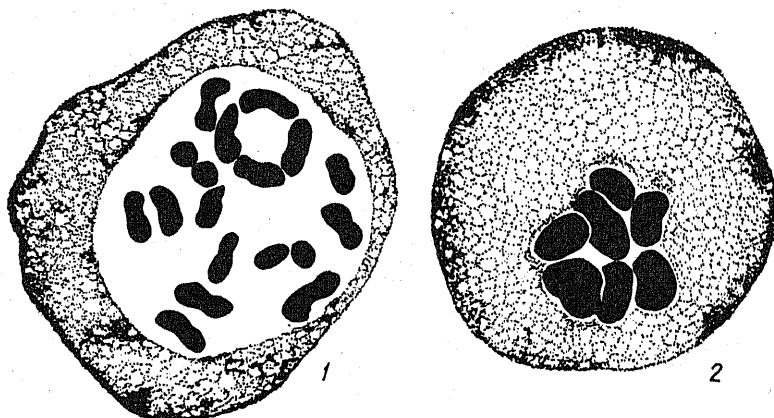


Рис. 96. Мейотическое деление у автополиплоида мышиного горошка:

1 — диакинез; 2 — метафаза I из семи квадривалентов. По И. Н. Свешниковой.

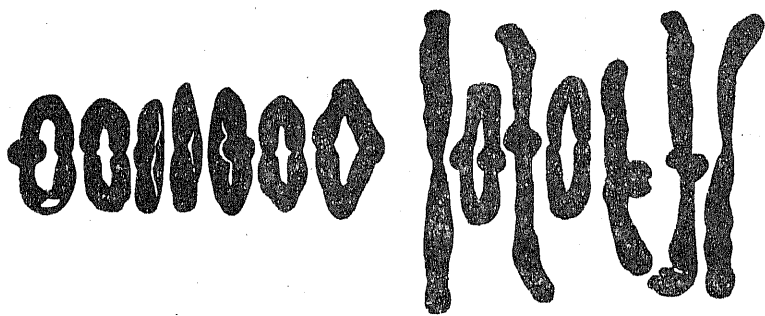


Рис. 97. Различные типы бивалентов у ржи сорта Бятка после инкухты (I_8) в метафазе I мейоза: *справа* — близкие к норме (закрытые); *слева* — большинство бивалентов с одной хиазмой (открытые). По Н. Т. Кахидзе.

У автополиплоидов также могут быть нарушения в мейозе. Например, нередко вместо бивалентов в диакинезе образуются тетра- (квадриваленты), три- и униваленты. Расхождение хромосом также не всегда нормальное. Например, у мышиного горошка (*Vicia cracca*, $2n=4X=28$) отмечено начало образования тетравалентов в диакинезе и окончательно сформированные семь тетравалентов в метафазе I, но один из них встречался не всегда (рис. 96).

Ненормально протекает мейоз у гаплоидов — организмов, содержащих один геном. В этом случае биваленты не образуются или их немного, хромосомы беспорядочно отходят к полюсам, формируются ядра с неодинаковым числом хромосом. Кроме тетрад, наблюдаются гексады и пентады. Пыльца получается полностью или частично стерильной. Зародышевые мешки также часто оказываются с отклонениями от нормы.

У полисомиков, имеющих дополнительно к нормальному числу хромосом одну или несколько добавочных, также наблюдаются нарушения в мейозе, приводящие к образованию стерильных зародышевых мешков и пыльцевых зерен.

Длительный инкухт перекрестноопыляющихся культур может сказываться на ходе мейоза. Так, у некоторых форм ржи в восьмом поколении увеличивается число открытых бивалентов (рис. 97), т. е. ослабляется конъюгация.

Все рассмотренные выше отклонения от нормы в мейозе у гибридов при отдаленной гибридизации, воздействии мутагенами, у полиплоидов, анеуплоидов, гаплоидов приводят к частичной или полной стерильности как пыльцевых зерен, так и зародышевых мешков.

При полной стерильности пыльцы и зародышевых мешков не удастся получить потомство.

Мейоз и гаметогенез у отдаленных гибридов и амфидиплоидов

Нарушения в мейозе у отдаленных гибридов и амфидиплоидов — главная причина их бесплодия. Для того чтобы яснее представить объекты, о которых идет речь в данном разделе, поясним, что отдаленные гибриды происходят от скрещивания растений, относящихся к разным видам или родам. Например, мягкая пшеница и твердая — два разных вида, имеющие соответственно $2n=42$ и $2n=28$, основное число хромосом (X) у той и другой семь. Геномная формула мягкой пшеницы обозначается AABBDD, твердой пшеницы — AABB. При скрещивании их между собой возникает отдаленный гибрид первого поколения AABB, что можно записать таким образом:

$$\text{♀ AABBDD} \times \text{♂ AABB} \rightarrow \text{F}_1 \text{AABB}$$

Гаметы родителей имеют геномы ABD (♀) и AB (♂) и соответственно гаплоидные наборы хромосом $n=21$ (♀) и $n=14$ (♂). Гибрид первого поколения будет иметь $2n=35$.

Теоретически ожидаемые результаты при изучении конъюгации хромосом в первом делении мейоза у родительских форм должны быть следующие: 21 бивалент (или условно 21_{II}) у мягкой пшеницы и 14 бивалентов (14_{II}) у твердой. В данном примере отцовская форма имеет меньшее число бивалентов, чем материнская. Наличие 5В хромосомы у пшеницы препятствует конъюгации гомеологичных хромосом, поэтому мультиваленты у естественных аллополиплоидов пшеницы встречаются редко.

У гибрида в случае гомологии геномов (A, B) нужно ожидать 14 бивалентов (14_{II}) и семь унивалентов генома D (7_I). Как показывают наблюдения, парная конъюгация у гибридов нередко отличается от теоретически ожидаемой.

Разберем еще пример образования отдаленного гибрида с участием пшеницы и ржи. От скрещивания мягкой пшеницы с геномом AABBDD и ржи с геномом RR возникает гибрид с геномом ABDR. Если исходные формы имели $2n=42$ и $2n=14$, то гибрид имеет $2n=28$ ($21+7$). Поскольку в гибрид вошли негомолгичные геномы, то вряд ли можно ожидать у них образования бивалентов в мейозе. Если обработать колхицином гибридные семена первого поколения, то возникают амфидиплоиды с геномной формулой AABBDDRR, имеющие $2n=56$. Такие формы, получившие название тритикале (от слов *Triticum* и *Secale*), являются октаплоидами ($2n=8X=56$). Существуют гексаплоидные ($2n=6X=42$) тритикале (AABBRR) — одна из возможных геномных формул) и тетраплоидные тритикале ($2n=4X=28$), у которых геномная формула AARR или BBRR.

В 1888 г. немецкий селекционер Римпау впервые выделил среди стерильных пшенично-ржаных гибридов фертильную форму промежуточного типа. В СССР Г. К. Мейстер в 1930 г.

получил новую форму фертильных пшенично-ржаных гибридов промежуточного типа, которая была цитологически изучена Г. А. Левитским и Г. К. Бенецкой. Сорты тритикале созданы А. Ф. Шулындиным в Украинском институте растениеводства, селекции и генетики им. В. Я. Юрьева, Кишеш — в Венгрии. В Канаде есть сорт Rosner. Большую работу с тритикале ведут в Главном ботаническом саду АН СССР. Один из недостатков тритикале — нарушение мейоза, что ведет к появлению анеуплоидов (причем чаще *гипоплоидов*, т. е. форм с уменьшенным числом хромосом), к снижению плодovitости растений. Пока форм тритикале с полностью нормальным мейозом не обнаружено.

Исходя из геномных формул тритикале у них в отличие от отдаленных гибридов первого поколения в первом делении мейоза следует ожидать образования бивалентов: у октаплоидов — 28, у гексаплоидов — 21, у тетраплоидов — 14. Однако и здесь при наблюдении обнаруживаются отличия от теоретически ожидаемых результатов. Следует отметить сразу, что, хотя нарушения в мейозе имеются как у отдаленных гибридов, так и у амфидиплоидов, но у каждого из них эти нарушения имеют свои особенности.

Еще Г. Д. Карпеченко (1935) отметил, что отдаленные скрещивания делятся на две группы: *конгруэнтные* и *инконгруэнтные*. Гибриды первой группы обычно фертильные, второй группы — частично или полностью стерильные. Причем стерильность наблюдается как в случае скрещивания исходных форм с одинаковым, так и с разным числом хромосом. У отдаленных гибридов наблюдается шесть типов конъюгации хромосом: нормальная конъюгация, или *эусиндез*; неопределенная конъюгация, или *пойкилосиндез*; частичная конъюгация, или *гипосиндез*; отсутствие конъюгации, или *асиндез*; сверхконъюгация, или *гиперсиндез*; кольцевая конъюгация, или *циклосиндез*.

У амфидиплоидов отмечено два типа конъюгации хромосом: *автосинтез*, когда конъюгируют хромосомы одного родительского вида, и *аллосинтез*, когда в конъюгацию вступают хромосомы разных видов. Если имеются различия по длине хромосом, эти два типа конъюгации можно установить при наблюдении под микроскопом. Образование гомоморфных бивалентов говорит об автосинтезе, гетероморфных — об аллосинтезе.

В случае частичной гомологии хромосом родительских видов образуются биваленты у гибридов первого поколения и ассоциации из нескольких хромосом — *мультиваленты* — у амфидиплоидов.

В 1945 г. Ли совместно с другими исследователями отметил разницу в числе бивалентов у мягкой пшеницы, сравнивая раннюю пахитену и диплотену. К концу профазы I бивалентов было меньше, чем в пахитене. Было предложено называть отсутствие конъюгации хромосом, которое ведет к образованию унива-

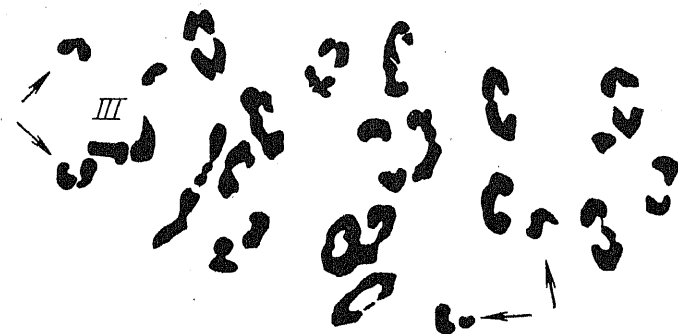


Рис. 98. Метафазные пластинки хромосом в микроспороцитах тритикале от скрещивания *Triticum durum* и *Secale montanum* ($2n=41$; $7_{III}+17_{II}+4_I$). Две пары преждевременно разошедшихся унивалантов показаны стрелками; тривалент в виде цепи отмечен знаком III. По Б. В. Ригину и И. Н. Орловой.

лентов, асинансисом и появление псевдоунивалантов при наличии конъюгации в пахитене — десинапсисом. Десинапсис ведет к преждевременному расхождению бивалентов или мультивалентов в профазе I и появлению псевдоунивалантов. Это явление характерно как для отдаленных гибридов, так и для амфидиплоидов. Причина его — генные мутации.

Следовательно, нужно различать истинные и ложные униваланты. Последние свидетельствуют о некотором родстве хромосом родительских видов. Обычно псевдоуниваланты, возникшие из одного бивалента, располагаются симметрично относительно друг друга, имея одинаковые размеры и форму (рис. 98). Центромера при этом ориентирована к полюсам веретена. Униваланты можно легко отличить от бивалентов, так как они не встраиваются в экваториальную пластинку (рис. 99) и могут располагаться по всему веретену, случайно распределяться в анафазе I, делиться эквационно в анафазе II. Униваланты нередко отстают в анафазе I, образуя микроядра в диаде. Известны случаи, когда унивалант растягивается к разным полюсам и центромера рвется поперек. При этом образуются *телоцентрические хромосомы*. Такие хромосомы способны давать *изохромосомы* с равными по размеру и генетически идентичными пледами.

У отдаленных гибридов и амфидиплоидов в мейозе образуются мультиваленты при конъюгации частично гомологичных хромосом.

При этом тривалент чаще всего образует цепочку, а тетравалент — либо цепочку, либо кольцо. Реже встречаются гексаваланты в виде открытой или замкнутой цепочки. Наличие мультивалентов свидетельствует о том, что генетический контроль парной конъюгации ослаблен.

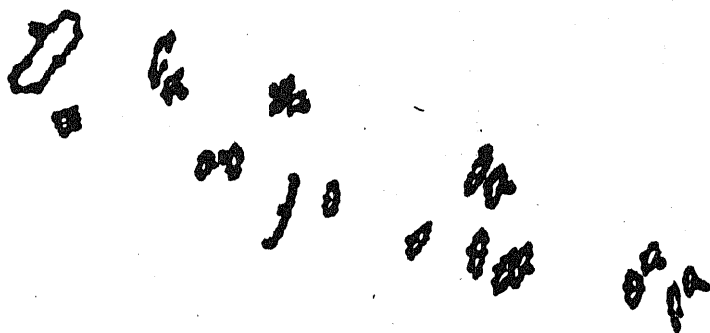


Рис. 99. Метафаза I мейоза пшенично-пырейного гибрида ($2n=43$, $19_{II}+1_{IV}+1_{I}$). Видно, что большинство бивалентов закрытые, один открытый, кольцо квадริвалента и унивалент — пырейного происхождения. По Sutka.

Из других нарушений в мейозе необходимо отметить образование мостов, многополюсность и формирование нескольких веретен, гетероцикличность (разная продолжительность фаз митотического цикла у геномов, входящих в ядро гибрида), цитомиксис (миграция хромосом из одной клетки в другую, чаще всего в профазе I).

При скрещивании растений, отличающихся типом опыления, например самоопыляющейся пшеницы и перекрестноопыляющейся ржи, геномы исходных форм могут претерпевать изменения. Так, у самоопыляющейся тритикале геном ржи претерпевает изменения, вплоть до возникновения генных мутаций, что отражается на развитии растений. Не случайно у тритикале существует асинхронность в сроках готовности к оплодотворению мужского и женского гаметофитов. Разрыв достигает 7—10 дней у октаплоидов, что ведет к череззернице, эмбриогенез замедлен, отмечаются нарушения в формировании клеточного эндосперма.

Для оценки цитологической стабильности тритикале учитывают:

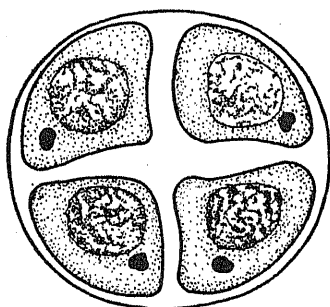
число микроспороцитов с частичным неспариванием хромосом, характер хромосомных ассоциаций (подсчет числа бивалентов, унивалентов, мультивалентов);

интенсивность конъюгации, т. е. число бивалентов и иных ассоциаций на один микроспороцит;

число конъюгирующих пар плеч хромосом в клетке;

степень правильности распределения хромосом по дочерним клеткам в первом и втором делениях мейоза (подсчет диад и тетрад с отставшими хромосомами и число отстающих хромосом в каждом случае);

Рис. 100. Тетрада микроспор с микроядрами.



процент анеуплоидных материнских клеток пыльцы в пыльниках;
число хромосом в анеуплоидных материнских клетках пыльцы;
процент анеуплоидных растений в популяции растений.

Такой подробный анализ можно осуществить только после того, как на препаратах отработана методика распознавания унивалентов, открытых и закрытых бивалентов, мультивалентов, нерасхождения хромосом, микроядер в диадах и тетрадах, полиад микроспор, образования мостов и фрагментов, многополюсности, цитомиксиса и др.

Результаты анализа мейоза записывают в таблицу и на основании расчетов дают формулу метафазы I с указанием числа бивалентов, унивалентов, мультивалентов:

Номер поля зрения	Число клеток в стадии						Число диад		Число тетрад			
	метафазы I			анафазы I								
	в норме	с унивалентами	с мультивалентами	в норме	с мостами	с оставшим хромосомами	с совмещением I и II делений	в норме	с микроядрами	в норме	полиад	с микроядрами

В селекционной практике при анализе отдаленных гибридов нередко ограничиваются определением соотношения (в %) нормальных тетрад и тетрад с микроядрами (рис. 100), а затем дополняют этот анализ определением фертильности пыльцевых зерен.

Анализ нарушений в мейозе у автополиплоидов

Известно, что искусственно полученные автополиплоиды нередко имеют пониженную плодовитость и среди них встречаются анеуплоиды. Анализ мейоза необходим в таких случаях, чтобы выявить причины, вызывающие подобные явления. Нормальная плодовитость растений обычно имеет место при стабильном мейозе, т. е. при отсутствии каких-либо нарушений.

Поскольку автополиплоиды имеют более двух гаплоидных наборов хромосом, у них в мейозе следует ожидать во время

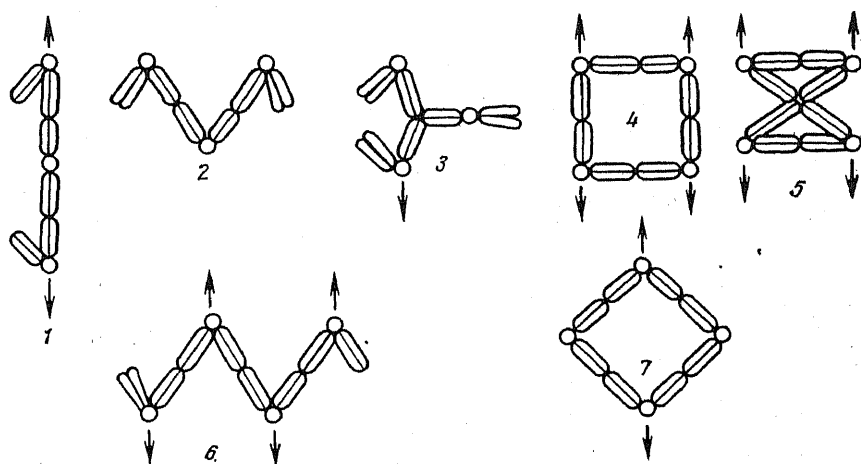


Рис. 101. Типы координат у три- и тетраплоидов в метафазе I мейоза: 1 — линейный; 2, 6 — конвергентный; 4, 5 — параллельный; 3 — индифферентный; 7 — дискордантный. По В. И. Семенову.

конъюгации образования ассоциаций более чем из двух хромосом. Однако, как показывают наблюдения, у автополиплоидов наряду с мультивалентами образуются биваленты и униваленты в отличие от аллополиплоидов, у которых обычна бивалентная конъюгация хромосом.

Формирование мультивалентов более характерно для тех видов растений, которые имеют в кариотипе длинные хромосомы. Чаше образуются поливаленты и при медианном расположении центромера. Кроме того, на образование мультивалентов оказывают влияние характер образования хиазм, генотип, условия среды и другие факторы.

Важным моментом в мейозе является процесс *координатации центромерных участков*, который осуществляется сразу после завершения диакинеза. Суть этого явления в том, что в норме в метафазе I центромеры бивалентов фиксируются в строго определенном положении по отношению к экватору веретена и направлены к противоположным полюсам (рис. 101).

У три- и тетраплоидов встречается несколько типов координат центромер: линейный (цепочечный), зигзаг (конвергентный), параллельный, индифферентный, дискордантный. Большие шансы на правильное расхождение хромосом в анафазе I в тех случаях, когда формируются поливаленты в виде цепочек или колец с минимальным числом хиазм и максимальной их терминализацией.

Наблюдения Мюнтцинга за типами координат центромер у естественных полиплоидов показали, что у них, например у

ежи сборной, частота зигзаг-ориентаций (см. рис. 101) в мейозе превышает 70%.

Таким образом, анализ типов коориентаций центромер у автополиплоидов представляет определенный интерес для цитогенетиков. У автополиплоидов чаще анализируют метафазу I, анафазу I и тетрады микроспор. В метафазе подсчитывают число мультивалентов, бивалентов и унивалентов на 100 клеток микроспороцитов и составляют формулу метафазы I.

Удобный объект — тетраплоидная рожь ($2n=4X=28$). Фиксированные колосья ржи анализируют на давленных препаратах, окрашенных по Фельгену или ацетокармином. Результаты заносят в следующую таблицу:

Номер препарата	Номер поля зрения	Метафаза I			
		квадриваленты (IV)	триваленты (III)	биваленты (II)	униваленты (I)

Допустим, подсчеты показали, что формула метафазы I $2_{IV} + 3_{III} + 5_{II} + 1_I$, т. е. выявлено 2 квадриналента, 3 тривалента, 5 бивалентов и 1 унивалент. Следует заметить, что анализ каждого растения у тетраплоидов ведут отдельно, так как между растениями одного варианта могут быть существенные различия.

В анафазе I подсчитывают распределение хромосом по полюсам, например 14—14, 15—13 и др. Эти результаты дадут возможность прогнозировать у данных растений появление анеуплоидов.

Отдельно учитывают клетки с отставшими унивалентами и определяют процент отношения таких клеток к общему их числу (в %).

У тетраплоидной свеклы происходит постмейотическая фрагментация ядер (по типу амитоза), т. е. из одного микроспороцита возникает больше четырех клеток. Это влечет за собой появление гамет с несбалансированным числом хромосом. Для выяснения причин этого явления анализируют тетрады микроспор.

В таком анализе учитывают нормальные тетрады, тетрады с микроядрами, пентады, гексады и др. После анализа хода мейоза целесообразно определить фертильность пыльцы у тех растений, которые изучали. Такое определение позволит получить полное представление о причинах нормальной и пониженной плодовитости автополиплоидов.

ПОЛОВОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ

ТИПЫ ПОЛОВЫХ МЕХАНИЗМОВ. ПОЛОВЫЕ ХРОМОСОМЫ. СИСТЕМЫ ПОЛОВОГО РАЗМНОЖЕНИЯ

Большинство видов покрытосеменных растений имеет обоеполые цветки. Кроме того, существуют однодомные виды, у которых мужские и женские соцветия находятся на одном растении (кукуруза, огурец, тыква), и двудомные, у которых мужские и женские соцветия развиваются на разных растениях (конопля, хмель). Существуют виды растений, которые несут в себе признаки гермафродитов и однодомных, гермафродитов и двудомных.

Половые хромосомы и сцепление с полом обнаружены не только у человека и животных (см. с. 151), но и у некоторых видов растений. Ранее другие половые хромосомы обнаружили у элодеи. У конопли (*Cannabis sativa*, $2n=20$), хмеля (*Humulus lupulus*, $2n=20$), дремы (*Melandrium album*, $2n=22$), щавеля (*Rumex angiosarpus*, $2n=14$), облепихи (*Hippophaë ramnoides*, $2n=24$) растения с женскими соцветиями имеют половые хромосомы XX (гомогаметный пол), а с мужскими — XY (гетерогаметный пол). На рисунке 102 показаны половые хромосомы X и Y дремы белой: сегмент I хромосомы Y подавляет развитие пестиков. Сегмент II содержит гены, контролирующие первые стадии развития пыльников, а сегмент III — гены, контролирующие последние этапы развития пыльников. У полиплоидной земляники (*Fragaria elatior*) гетерогаметен женский пол (XY), а мужской — гомогаметен (XX).

У растений-самоопылителей (пшеница, овес, рис, ячмень, горох и др.) в процессе оплодотворения обычно сливаются гаметы одного растения из одного цветка, т. е. происходит родственное скрещивание. У перекрестноопыляющихся растений (рожь, кукуруза, свекла, конопля и др.) при оплодотворении сливаются гаметы от разных растений. Самоопылители с не полностью клейстогамными, т. е. скрытоопыляемыми, цветками могут иметь и открытое цветение, и при этом перекрестное опыление (пшеница). Последний процесс во многом зависит от сортовых особенностей и метеорологических условий.

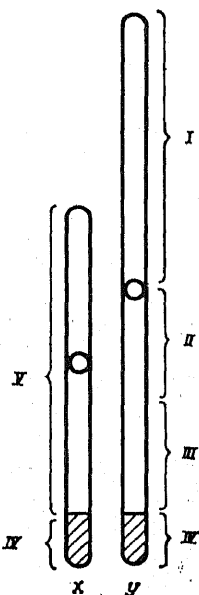


Рис. 102. Схематическое изображение X- и Y-хромосом дремы белой (*Melandrium album*). Гомологичные сегменты заштрихованы. По Westergaard.

ОПЫЛЕНИЕ И ПРОРАСТАНИЕ ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЕРЕН

У перекрестноопыляющихся растений в естественных условиях пыльцевые зерна попадают на рыльце пестика при помощи ветра (рожь, кукуруза) или насекомых (гречиха, подсолнечник). У самоопылителей — пшеницы, ячменя, гороха — пыльники вскрываются внутри цветков и высыпают пыльцу на рыльце. У некоторых видов растений, например арахиса, пыльцевые зерна прорастают в пыльниках. Образующиеся пыльцевые трубки направляются к рыльцу и семязпочке.

В эмбриологической и селекционной практике пыльцу нередко приходится наносить на рыльце искусственно кисточкой или пинцетом после предварительного удаления тычинок из цветков (кастрации). При искусственном опылении необходимо обильно покрывать рыльце пыльцой, хотя в естественных условиях, если пестик имеет одну семязпочку; для оплодотворения достаточно небольшого числа пыльцевых зерен. Так, в ТСХА при ветроопылении яровой пшеницы на рыльце попадало в большинстве случаев одно-три пыльцевых зерна, но завязываемость семян была удовлетворительной.

При изучении опыления и оплодотворения следует учитывать жизнеспособность рылец и пыльцевых зерен. Известно, что рыльце пшеницы сохраняет жизнеспособность в течение нескольких дней (иногда девять), но число цветков с завязавшимися семенами постепенно уменьшается и составляет на девятый день 1,25% от числа опыленных.

Пыльцевые зерна пшеницы на солнце быстро гибнут, поэтому опылять лучше зрелыми пыльниками, которые снимают с колоса и сразу же помещают внутрь цветков кастрированного колоса.

У кукурузы на воздухе пыльцевые зерна теряют жизнеспособность через 2—3 ч. Однако их жизнеспособность можно сохранить в эксикаторах при относительной влажности воздуха 76% не более трех дней. Рыльца кукурузы сохраняют жизнеспособность дольше — 12—14 дней. При благоприятных условиях жизнеспособные пыльцевые зерна, попав на рыльце, выделяют жидкие секреты, а нежизнеспособные — нет. Наблюдения за злаками показали, что жидкие секреты выделяют не только пыльцевые зерна, но и рыльца. Жизнеспособные пыльцевые зерна вскоре образуют пыльцевые трубки, которые внедряются в ткани рыльца. В пыльцевую трубку переходят вегетативное ядро и спермии.

Во время прорастания пыльцевых зерен в пестике изменяется его физиологическое состояние: прижизненная кислотность (рН), окислительно-восстановительный потенциал (rH_2), содержание физиологически активных веществ (ауксинов, сахаров, ферментов, аминокислот и др.). Те пыльцевые трубки, которые

не в состоянии вызвать физиологические изменения в пестике, обычно медленно растут, образуют вздутия на концах и не достигают зародышевого мешка.

Пыльцевые трубки в столбике растут или по каналам, или по межклетникам. Число пыльцевых трубок, растущих в столбике и достигших микропиле, неодинаково. Нередко зародышевого мешка достигает всего одна пыльцевая трубка и изливает свое содержимое в одну из синергид, разрушая ее. Многие исследователи наблюдали вращение нескольких пыльцевых трубок в зародышевый мешок.

Скорость роста пыльцевых трубок в пестике у различных видов неодинакова. Очень быстро растут пыльцевые трубки в столбике кукурузы. По наблюдениям Мюллера, скорость их роста составляет 6,25 мм в час. Гораздо медленнее растут пыльцевые трубки у плодовых растений.

НЕСОВМЕСТИМОСТЬ У РАСТЕНИЙ

У растений существуют различные приспособления, предупреждающие самоопыление и обеспечивающие перекрестное опыление внутри вида, вплоть до генетических систем несовместимости. При проведении скрещиваний между разными видами наблюдается видовая несовместимость.

Под *несовместимостью* понимают неспособность пыльцевых трубок проникнуть через весь столбик к зародышевому мешку. В результате такого явления при самоопылении некоторых перекрестноопыляющихся растений оплодотворения своей пылью не происходит. При этом нормальные пыльцевые зерна не прорастают на рыльце пестика своего растения, но хорошо прорастают на рыльце пестиков других растений того же вида, имеющих другой генотип.

Известно несколько систем несовместимости.

Гаметофитная несовместимость проявляется при прорастании пыльцевых трубок в столбике. При этом оказывается, что если пыльцевая трубка несет аллели локуса s , не совпадающие с аллелями пестика, то рост трубок идет нормально. Например, если трубки несут аллели s_1, s_2 , а пестик имеет аллели s_3, s_4 , несовместимости не наблюдается. При совпадении аллелей пыльцевых зерен и пестика рост трубок прекращается, например пыльцевые зерна имеют аллели s_1, s_2 и столбик — $s_1 s_2$. При комбинации аллелей $s_1 s_2 \times s_1 s_3$ прорастает половина пыльцевых трубок.

При гаметофитной системе несовместимости, обычно обладающей серией множественных аллелей, завязывание семян невозможно при самоопылении и при перекрестном опылении в том случае, когда совпадают аллели пыльцевых зерен и столбика. Эта же система несовместимости обнаружена у табака,

свеклы, овсяницы, ржи, отдельных видов клевера, картофеля. Предполагают, что у ржи несовместимость обусловлена взаимодействием аллелей не одного, а двух локусов.

Спорофитная несовместимость — это такая, при которой поведение пыльцевых трубок обусловлено диплоидным генотипом растений. Она обнаружена у некоторых видов из семейств сложноцветные (астровые) и крестоцветные (капустные). Реакция несовместимости протекает на поверхности рыльца, и нередко определяется геном *s* с множественными аллелями. Эта система менее эффективно ограничивает инбридинг.

Гетероморфная несовместимость известна у гетеростильных растений: примулы, гречихи, льна. Этот тип несовместимости часто рассматривают как разновидность спорофитной, так как рост пыльцевых трубок в пестике определяется диплоидным спорофитом.

Нормальное завязывание семян у гречихи происходит в том случае, когда пыльца из длинностолбчатых цветков (генотип *ss*) попадает на рыльце короткостолбчатых (генотип *Ss*) или, наоборот, при комбинации генотипов *Ss* × *ss*, т. е. при легитимном опылении. Потомство от такого опыления будет состоять из растений с коротко- и длинностолбчатыми цветками в соотношении 1 : 1. Плоды других типов опыления у гречихи гибнут.

Несовместимость наблюдается не только при внутривидовых, но и при межвидовых скрещиваниях. Проявляется она после опыления. Цитологические исследования обычно проводят на опыленных столбиках. Подавление прорастания пыльцы можно наблюдать на рыльце или в столбике. Замедление роста трубок, образование вздутий на их концах — обычное явление при изучении несовместимости. Однако иногда пыльцевые трубки нормально вырастают до семязпочек, но оплодотворения не происходит или образовавшиеся зародыши гибнут на разных этапах развития. Подобная несовместимость в семязпочке описана у шоколадного дерева, львиного зева и других родов.

В лабораторных условиях по скорости роста пыльцевых трубок можно определить, совместимы или нет комбинации скрещивания у растений, что имеет практическое значение. Так, не все сорта черешни совместимы между собой при скрещивании, то же наблюдается у сливы и других культур. Скорость роста пыльцевых трубок от совместимых и несовместимых скрещиваний неодинакова. Особенно заметна разница в росте пыльцевых трубок при повышенной температуре. В зарубежной практике используют такой прием: срывают цветки вишни или сливы, опыляют их и держат при температуре 30°C. Через 20 ч по степени роста пыльцевых трубок можно определить совместимость той или иной комбинации.

В ТСХА изучали совместимые и несовместимые скрещивания у гречихи. При температуре 12—15°C пыльцевые трубки у

сорта Большевик от легитимного (законного) опыления обнаруживались в пестике через один час, при иллегитимном (незаконном) опылении — через два часа, т. е. скорость появления пыльцевых трубок при совместимом типе опыления была в два раза больше. При 35—40°C пыльцевые трубки были обнаружены через 15 мин — после легитимного опыления и через 60 мин — после иллегитимного. Таким образом, с повышением температуры пыльцевые трубки прорастали быстрее, а скорость их появления при совместимом типе опыления была больше уже в четыре раза.

ДВОЙНОЕ ОПОЛОДОТВОРЕНИЕ (АМФИМИКСИС)

Оплодотворение впервые наблюдал у низших растений Принсгейм в 1856 г., у голосеменных — И. Н. Горожанкин в 1880—1883 гг. В 1884 г. Э. Страсбургер описал у покрытосеменных растений вхождение пыльцевой трубки в зародышевый мешок через микропиле и слияние мужского ядра с ядром яйцеклетки (амфимиксис). Двойное оплодотворение, присущее покрытосеменным растениям, открыл в 1898 г. С. Г. Навашин сначала у лилейных, а позднее у представителей других семейств (рис. 103, А).

У цветковых растений пыльцевая трубка обычно проникает в зародышевый мешок через микропиле и изливает свое содержимое в одну из синергид. На рисунке 103, Б видно, что синергида, в которую излила свое содержимое пыльцевая трубка, разрушена, вторая синергида целая. Высвобождается пара спермиев, и один из них сливается с ядром яйцеклетки. Образуется зигота с диплоидным набором хромосом, дающая начало диплоидному зародышу семени. В зиготе объединяется наследственная информация материнского и отцовского организма и восстанавливается парность гомологичных хромосом. Второй спермий сливается с диплоидным ядром центральной клетки зародышевого мешка. От слияния этих ядер образуется триплоидная зигота, дающая начало *эндосперму* — питательной ткани.

Различают несколько способов внедрения пыльцевой трубки в зародышевый мешок: *порогамия* (через микропиле), *апорогамия* (частный случай этого способа — халазогамия, когда трубка входит через халазу) и *мезогамия* (трубка входит сбоку между микропиле и халазой). Наиболее распространен первый способ.

Процесс двойного оплодотворения у различных видов имеет некоторые особенности. Так, слияние спермиев с ядрами яйцеклетки и центральной клетки может быть одновременным и разновременным. Полярные ядра могут сливаться до оплодотворения, образуя диплоидное центральное ядро, или одновременно может происходить слияние полярных ядер со спермием с образованием триплоидной зиготы. Иногда не происходит

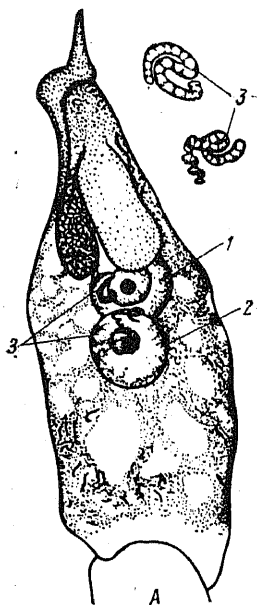
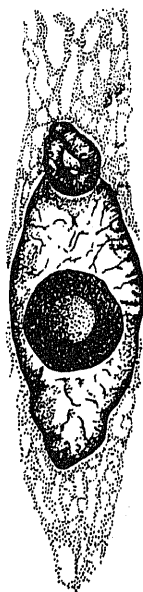
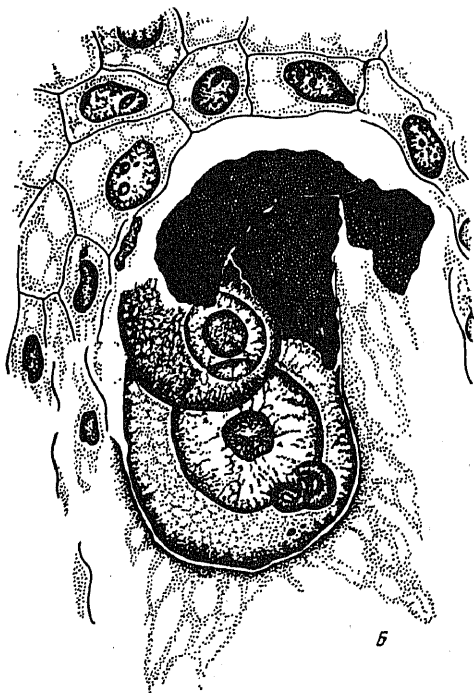


Рис. 103. Двойное оплодотворение:

А — у подсолнечника; по С. Г. Навашину: 1 — яйцеклетка; 2 — центральное ядро; 3 — спермин; Б — у пиона; по М. С. Яковлеву и М. Д. Иоффе: *слева* — спермий в контакте с ядром яйцеклетки, *справа* — слияние центрального ядра с ядром спермия.



слияния спермия с ядром центральной клетки, в таком случае эндосперм не образуется (у орхидей), или отсутствует слияние спермия с ядром яйцеклетки, и не образуется зародыш (отмечено у пшеницы и гречихи) — образующиеся при этом семена не прорастают.

Е. Н. Герасимова-Навашина подробно изучила все последовательные этапы оплодотворения: внедрение спермия в ядро яйцеклетки, постепенное его разрыхление, потерю формы, выделение спермием ядрышка в ядре яйцеклетки, постепенное сближение и слияние ядрышек спермия и яйцеклетки (рис. 104). Она различает два основных типа оплодотворения: *премитотический* и *постмитотический*. При первом объединении ядер гамет предшествует митозу зиготы. Такое слияние ядер часто наблюдается у покрытосеменных. Для другого типа характерно окончательное слияние ядер гамет после начала митоза, а до этого спермий проникает в яйцеклетку, но с ее ядром не сливается. Кроме этих типов оплодотворения, встречается *промежуточный* (арахис).

Триплоидный эндосперм образуется у растений, имеющих зародышевый мешок Poligonum-типа. Известны и другие типы зародышевых мешков (см. с. 223), в которых эндосперм может иметь число хромосом от $2n$ до $15n$.

Продолжительность периода от опыления рыльца пестика до вставания трубок в зародышевый мешок и последующего оплодотворения сильно варьирует в зависимости от вида растений, погодных условий, типа скрещивания (внутри- или межвидовое) и других факторов. У лесных деревьев от опыления до оплодотворения проходит много времени (11—14 мес у сосны и дуба). У яблони и груши этот период составляет всего пять дней. Еще меньше он у растений из семейств сложноцветные (астровые) и мятликовые. У скерды зеленой интервал между опылением и оплодотворением равен 40—50 мин, примерно такой же он у подсолнечника.

Исследования пшеницы показали, что пыльцевая трубка у нее входит в зародышевый мешок через 20 мин, а через 30 мин один из спермиев уже проникает в полярное ядро, а другой подходит к ядру яйцеклетки. Полярные ядра до оплодотворения не сливаются. Через 45 мин или через час после опыления спермий в полярном ядре частично теряет свой вид и выделяет одно-два ядрышка. Через 2—3 ч после опыления спермий уже нельзя различить, и косвенным доказательством оплодотворения служат ядрышки. Затем полярные ядра сливаются. В яйцеклетке ядрышки (вместо спермия) обнаруживаются через 12 ч после опыления.

У ячменя пыльцевая трубка при благоприятных условиях достигает полости зародышевого мешка через 25 мин. С момента высвобождения спермиев из пыльцевой трубки до их проник-

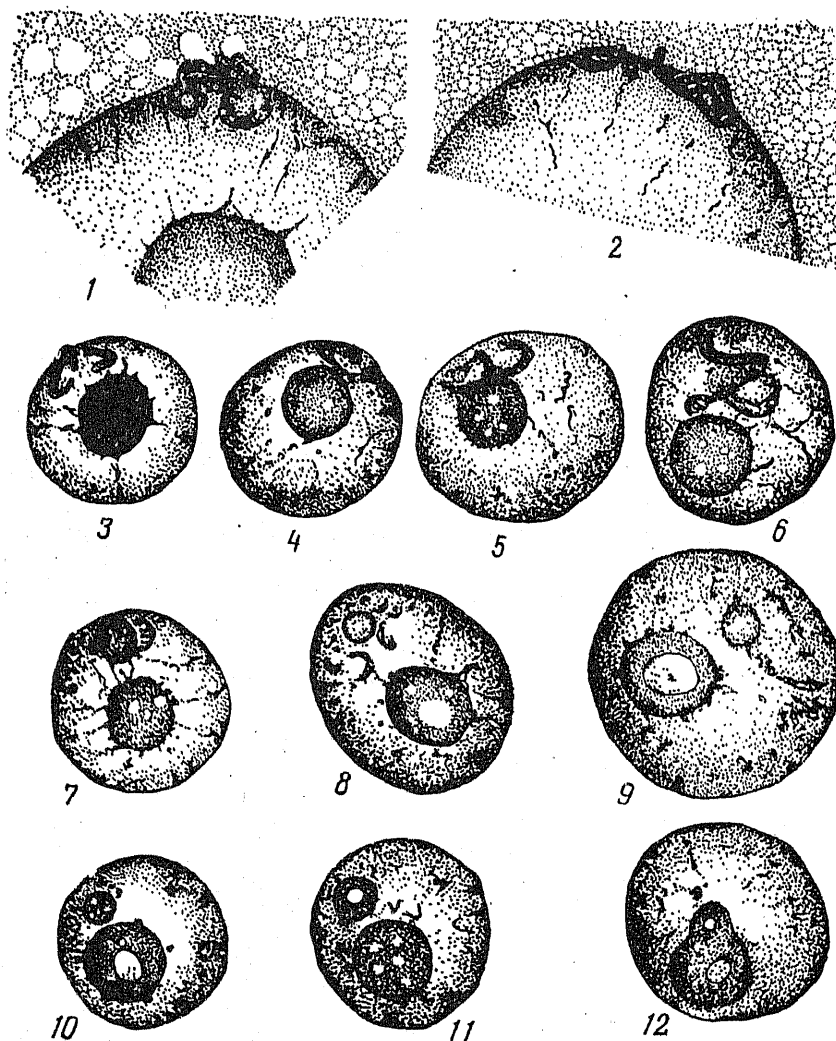


Рис. 104. Слияние яйцеклетки со спермием у скерды зеленой:

1 — часть ядра яйцеклетки со спермием, лежащим на ядерной оболочке; 2 — раскручивание ядра спермия; 3, 4 — погружение ядра спермия в ядро яйцеклетки; 5—9 — постепенное исчезновение нитей спермия и возникновение его ядрышка; 10—12 — сближение и слияние ядрышек спермия и яйцеклетки. По Е. Н. Герасимовой-Навашиной.

новения в ядро яйцеклетки и полярные ядра проходит всего 10—15 мин. У ржи спермии обнаруживаются в зародышевом мешке через 30—45 мин после опыления. Таким образом, для прорастания пыльцевых трубок и проникновения спермиев в ядра женских гамет требуется менее часа, процесс же слияния гамет

длится гораздо дольше — несколько часов. Однако географические и метеорологические факторы нередко изменяют указанные сроки оплодотворения у злаковых. У кукурузы пыльца начинает прорастать уже через 20 мин после попадания на рыльце при температуре воздуха выше 20 °С. В районе г. Москвы оплодотворение у нее происходит через 20—22 ч после опыления.

Оплодотворение вносит существенные изменения в физиологи зародышевого мешка и семяпочки. При этом многие жизненно важные процессы активизируются. Влияние оплодотворения не ограничивается семяпочкой, а, как показали исследования с изотопами в ТСХА, распространяется на все растение. Так, у растений гречихи под влиянием совместимого легитимного опыления и последующего оплодотворения активизируется минеральное (поступление P^{32} через корни) и воздушное (усвоение C^{14}) питание. Усиливается приток питательных веществ в оплодотворенные семяпочки.

Однако нормальный ход оплодотворения нередко нарушается вследствие неблагоприятных погодных условий, недостатка питания, облучения, при отдаленной гибридизации, полиплоидии, инбридинге у перекрестноопыляющихся растений, при запоздалом опылении и т. д. Поэтому во время эмбриологических исследований необходимо тщательно учитывать условия эксперимента.

При изучении картин двойного оплодотворения нередко испытывают затруднения в выборе фиксатора и способов окрашивания препаратов. Наиболее распространены фиксации по Навашину или Карнуа или предварительная фиксация — несколько минут по Карнуа, а затем по Навашину.

Спермию хорошо выявлять путем окрашивания препаратов по методу Фёльгена. Однако при этом ядра яйцеклетки часто не обнаруживают положительной реакции на ДНК до оплодотворения или эта реакция недостаточно четкая. Некоторым исследователям удавалось добиться положительной реакции на ДНК в ядре яйцеклетки, используя в качестве фиксатора 10%-й раствор формалина. Из других методов можно использовать окрашивание по Делафилдугу, Гейденгайну и Я. С. Модилевскому.

Методы приготовления препаратов и наблюдения пыльцевых трубок

Методика приготовления препаратов прорастающих пыльцевых трубок. Для изучения пыльцевых трубок у растений различных родов и семейств (*Antirrhinum*, *Brassica*, *Raphanus*, *Solanum* и др.) Герр со ссылкой на Dionne описал следующий метод фиксации, мацерации и окрашивания.

Опыленное рыльце фиксируют в уксусном спирте (3:1) в

течение 1 ч. Для мацерации его помещают в горячий 45%-й раствор уксусной кислоты при температуре 60°C на 10—60 мин, в зависимости от объекта. Для окрашивания готовят раствор, состоящий из 7,5 мл 2%-го раствора сафранина, 1 мл 2%-го анилинового голубого (растворы красителей водные, с добавлением 1—2 капли хлороформа в качестве антисептика) и 25 мл 45%-го раствора уксусной кислоты. Раствор подогревают до 75°C и перед употреблением фильтруют. Рыльце перед окрашиванием осторожно расчлениают иглой. Окрашивание длится 5—15 мин. После этого препарат мягко раздавливают и изучают под микроскопом.

Для фиксации и окрашивания пыльцевых трубок гречихи и злаков, по методикам Моррисона и Уоткинса, используют лактофенол с растворенным в нем 1%-м раствором красителя (кислый фуксин или кotton-блау). Для дифференцировки в ходе окрашивания применяют чистый лактофенол (см. с. 96).

Прорастающие пыльцевые зерна на рыльце и в столбике хорошо наблюдать после окраски ацетокармином. Для этого готовят 45%-й раствор ацетокармина с глицерином или молочной кислотой в соотношении 1:1. В эту смесь помещают опыленный столбик, затем препарат подогревают и изучают под микроскопом.

У плодовых и ягодных растений пыльцевые трубки хорошо окрашиваются метиленовым синим (0,1—0,01%) после фиксации 3%-м раствором формалина и легкого раздавливания на стекле.

Пыльцевые трубки в столбике хорошо выявляются раствором йода в йодиде калия (см. с. 210). Этот метод можно применять для изучения пыльцевых трубок у ржи, гречихи, пшеницы. В ряде случаев при использовании этого метода необходима обработка 60%-м раствором молочной кислоты при 60°C или 10%-м раствором КОН в 70%-м — этилового спирта. Четко окрашиваются пыльцевые трубки и по Фёльгену (см. с. 100).

Методика выявления пыльцевых трубок флуоресцентным методом

Можно взять опыленные свежие, а также фиксированные пестики в фиксаторе Чемберлена или уксусном алкоголе. Для мацерации тканей используют 1 н. растворы NaOH или КОН. Чтобы вызвать размягчение тканей томата, достаточно 1 ч при комнатной температуре, косточковым нужно двое-трое суток. Время обработки можно сократить, если кипятить объекты в щелочи в течение 10 мин. Затем их промывают в воде и помещают в раствор 0,1%-го анилинового синего, разбавленного 0,1 н. K_3PO_4 . Утром пестик переносят в каплю глицерина на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и осторожно расплющивают или разрезают вдоль лезвием бритвы, пользуясь стереоскопическим микроскопом. Просмотр ведут под микроскопом с освети-

телем ОИ-18 и светофильтрами УСФ-6 толщиной 3 и 5 мм или под люминесцентным микроскопом, наблюдая свечение пыльцевых трубок. Описанную методику удобно использовать для определения совместимости растений при скрещивании.

СЕЛЕКТИВНОЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЕ

Не все пыльцевые трубки обладают равной оплодотворяющей способностью, и если в столбике их прорастает несколько, то совершает оплодотворение обычно одна.

Гетерозиготные особи образуют гаметы нескольких типов. Так, генотип Aa дает гаметы A и a в соотношении 1:1. При этом можно ожидать, что поскольку гаметы гетерозиготной особи неодинаковы по составу наследственных факторов, то они по-разному будут участвовать в оплодотворении. Тогда при скрещивании гетерозигот $Aa \times Aa$ вместо ожидаемого расщепления по фенотипу 3:1 будет несколько иное расщепление, так как нарушается равная вероятность образования различных типов зигот. Данное явление называется селективным оплодотворением. Этот термин предложил Джонс. Установлено, что селективность оплодотворения зависит от скорости роста пыльцевых трубок, а последняя определяется действием гаметических факторов. Например, у кукурузы мелкие пыльцевые зерна не могут конкурировать с нормальными.

В 1902 г. Корренс впервые обнаружил отклонение от соотношения 3:1 в потомстве гибрида между рисовой и сахарной кукурузой. В одном случае наблюдалось 16% особей с рецессивными признаками вместо 25%. В 1922 г. он же наблюдал отклонение от ожидаемого расщепления в результате скрещивания женских гомозиготных особей дремы белой (*Melandrium album*) с гетерозиготными мужскими особями того же вида. В потомстве был избыток женских особей вместо ожидаемых 50%, что объясняли различной скоростью роста пыльцевых трубок, несущих определитель пола.

В опытах по опылению растений кукурузы, томата, хлопчатника и других культур смесями пыльцы Джонс обнаружил селективность оплодотворения. Исследования показали, что на селективность оплодотворения влияют различные факторы. Например, у сахарной свеклы при температуре воздуха 8—12°C пыльца тетраплоидов и диплоидов растет одновременно, а при более низкой температуре (4—5°C) пыльцевые трубки диплоидов обгоняют пыльцевые трубки тетраплоидов.

ЭНДОСПЕРМОГЕНЕЗ

Как указывалось выше, в зародышевом мешке оплодотворяются спермиями в норме только яйцеклетка и центральная клетка. На рисунке 105 показана центральная клетка зародышевого

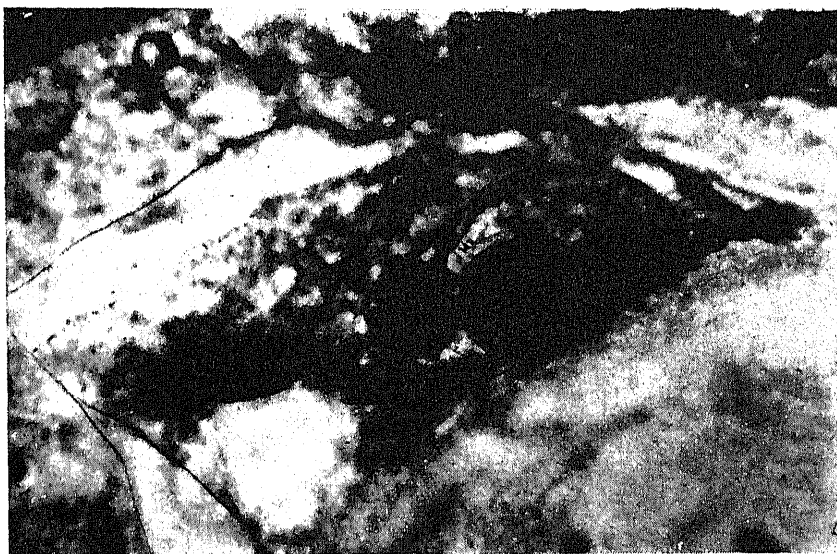


Рис. 105. Центральная клетка зародышевого мешка гречихи в момент слияния со спермием (микротомный препарат).

мешка гречихи в момент вхождения спермия. Когда заканчивается слияние ядер гамет, у возникающих зигот наступает митотическое деление. Обычно первой делится триплоидная зигота, дающая начало эндосперму, и лишь спустя некоторое время в деление вступает диплоидная зигота, из которой образуется зародыш, т. е. образование питательной ткани идет с некоторым опережением.

В условиях Украины у ярового сорта мягкой пшеницы Лютеценс 62 деление триплоидной зиготы, дающей начало эндосперму, наблюдалось через 5—6 ч после опыления, а первое деление диплоидной зиготы, дающей начало зародышу, — через 24 ч. Образовавшиеся два ядра эндосперма снова делятся через 6 ч. Таким образом, через 12 ч после опыления возникают четыре ядра эндосперма, через 18 ч — 8.

По данным Т. Б. Батыгиной (1962), у пшеницы объединение спермия с ядром центральной клетки заканчивается через 2—3 ч после опыления и еще через 1 ч после этого наступает первое деление триплоидной зиготы. В яйцеклетке объединение ядер заканчивается лишь через 6—7 ч после опыления, покой зиготы длится 16—18 ч, и только через 24 ч после опыления зигота делится.

Образование ядер эндосперма у пшеницы происходит по *нуклеарному типу*. В этом случае после деления ядер клеточные

перегородки не образуются, что дает циноцит (многоядерное образование). Спустя двое-трое суток после опыления появляются клеточные перегородки в микропиллярном конце зародышевого мешка. Затем они распространяются в халазальную часть, и через трое суток весь эндосперм становится клеточным. Полностью формирование клеточного эндосперма прекращается через 12 дней после опыления, когда у зерновки заканчивается рост в длину, но зато продолжается интенсивное накопление крахмала, алейроновых зерен и других веществ.

Примерно через пять дней после опыления антиподы сплющиваются. В это же время на поверхности эндосперма можно различить будущие клетки алейронового слоя по таблитчатой форме. Появляясь около плаценты, они опоясывают эндосперм в один ряд. В зрелой зерновке толщина этого слоя около 40 мкм. В нем много витаминов, жира и клетчатки. На седьмой день после опыления образуется пластидный крахмал. Все это время завязь увеличивается в размерах.

У представителей других семейств при формировании эндосперма встречается *клеточный тип*, при котором после каждого деления ядра сразу формируется клеточная перегородка. Реже встречается промежуточный тип (базальный, или гелобиаальный), при котором после первого деления образуются две клетки. В верхней происходит много делений с образованием свободных ядер. Нижняя клетка не делится. Однако в итоге эндосперм становится клеточным.

По Н. Н. Кулешову, развитие зерновки делят на несколько фаз. Несколько условно можно представить, что в первой фазе *формирования зерна* образуются клеточный эндосперм, пластидный крахмал и растет завязь. В следующей фазе *налива зерна* интенсивно накапливаются запасные белки, мелкозернистый крахмал и алейроновые зерна. В третьей фазе *созревания зерна* идут окончательные морфобиохимические процессы превращения запасных белков, алейроновых зерен и потеря воды.

У ржи, ячменя, овса образование и дифференциация эндосперма протекают сходно. Разница лишь в некоторых деталях (например, у ячменя алейроновый слой состоит из нескольких рядов клеток) и во времени протекания отдельных этапов.

У кукурузы развивается эндосперм двух типов — *мучнистый* и *роговидный*. У первого крахмальные зерна округлой формы, располагаются внутри клетки рыхло, у второго крахмальные зерна угловатой формы, более плотно прилегают друг к другу, а промежутки между ними заполнены белковыми веществами. У различных подвидов кукурузы расположение и содержание мучнистого и роговидного эндосперма неодинаковы, что сказывается на консистенции зерна. Эндосперм богат различными питательными и физиологически активными веществами. В начале своего развития он отличается более высокой физиологи-

ческой активностью по сравнению с зародышем, а позднее более активным становится зародыш.

Продолжительность развития эндосперма неодинакова у различных видов растений и составляет: у представителей семейства мятликовых — не менее 20—25 дней; у растений из семейства сложноцветные (астровые) — всего несколько дней, у древесных пород — несколько месяцев.

Соотношение размеров эндосперма и зародыша неодинаково у различных семейств. Так, у злаковых эндосперм крупный и занимает большую часть зерновки. У пшеницы и ржи он составляет более 70—80% ее массы. Это наиболее ценная часть ее, из которой получают лучшие сорта муки. У растений семейств пасленовые и гречишные размеры эндосперма и зародыша почти равны. У растений из семейств мотыльковые (бобовые), сложноцветные, тыквенные от эндосперма остаются следы, а запасные питательные вещества откладываются в семяздолях зародыша. Различные виды растений отличаются и по расположению эндосперма относительно зародыша.

У представителей семейств перечные, маревые развивается *перисперм* — другой вид питательной ткани, которая образуется из остатков нуцеллуса. Перисперм имеется в семенах свеклы, перца черного, куколя.

Эндосперм изучают на микротомных или тотальных препаратах. Последний метод удобен при изучении ранних фаз его развития. По методике Т. Ф. Петровой, тотальные препараты готовят следующим образом.

1. Фиксация семяпочек по Навашину (24 ч) для нуклеарного эндосперма или уксусным алкоголем (3 ч) для клеточного.

2. Просветление семяпочек в 10%-м растворе КОН, растворенном в 70%-м этиловом спирте.

3. Промывание в воде.

4. Препарирование семяпочек с выделением зародышевых мешков под микроскопом МБС-1 в отраженном свете.

5. Окрашивание зародышевых мешков по Фёльгену (гидролиз 20 мин в 1 н. растворе соляной кислоты при 60 °С) в часовых стеклах.

6. Обезвоживание в серии спиртов повышающейся концентрации.

7. Заключение в бальзам.

КСЕНИИ

Известно, что при посеве рядом двух сортов кукурузы — белозерного и желтозерного — на початках белозерного в год опыления завязываются зерновки с желтым эндоспермом. При опылении сахарной кукурузы пылью кремнистой изменяется консистенция эндосперма зерновок, развивающихся на материнском

растении. Так проявляется влияние сорта-опылителя на эндосперм семян в год опыления. Это явление получило название *ксении* (греч. ксенос — чужой). Термин предложил Фоке в 1881 г. Ксении представляют собой не что иное, как проявление доминирования. Из пары контрастных признаков проявляется лишь один.

Ксении наблюдаются только в том случае, когда пыльца отцовского сорта несет доминантные аллели, которые в зиготе будут подавлять рецессивные аллели материнского организма. Если материнское растение имеет доминантные аллели, то семена не будут обладать отцовскими признаками в год скрещивания. Следует заметить, что влияние отцовского сорта на признаки семян материнского в год опыления проявляется по-разному: оно может сказаться на зародыше, эндосперме, плодовой оболочке и т. д.

В агрономической практике под ксениями обычно понимают изменение признаков эндосперма.

ЭМБРИОГЕНЕЗ

Оплодотворенная яйцеклетка (диплоидная зигота) начинает делиться намного позднее, чем триплоидная зигота. Как указывалось выше, разница во времени, например, у пшеницы составляет 18 ч. Зигота, имеющая грушевидную форму, делится поперечной перегородкой на две клетки. Клетка, обращенная внутрь зародышевого мешка, называется *верхней*, или *апикальной* (лат. арех — верхушка), а нижняя — *базальной* (лат. basis — основание). Из апикальной клетки формируется *предзародыш* (проэмбрио), из базальной образуется *подвесок* (суспензор).

Направление и последовательность делений в апикальной и базальной клетках не совпадают (рис. 106). Первая делится продольной, а вторая — поперечной перегородками.

Через двое суток после опыления у пшеницы на месте зиготы имеются четыре клетки. Последующие деления в подвеске и предзародыше не совпадают во времени и протекают в разных плоскостях. Митозы в подвеске идут очень медленно по сравнению с проэмбрио.

Пятисуточный проэмбрио — многоклеточный, имеет грушевидную форму. Через семь-восемь дней после опыления начинается его дифференциация, характеризующаяся образованием впадины, отделяющей будущий щиток и колеоптиле. Через 10 дней после опыления намечаются почечка и эпибласт. В дальнейшем формируется корешок с чехликом, почечка дифференцируется на зачаточные листочки и весь зародыш увеличивается в размерах. В биотехнологии зародыш через 10—12 дней после оплодотворения используют для клонирования в культуре *in vitro*.

Подвесок, при помощи которого зародыш удерживается на стенке зародышевого мешка и потребляет питательные вещества из окружающих тканей, у злаковых не сохраняется до конца формирования зародыша и обычно лизируется (греч. лизис — растворение) через две недели после оплодотворения, когда сформируется корешок. На Украине у яровой пшеницы полная дифференциация зародыша заканчивается примерно через три недели после опыления.



Зародыш злаков состоит из одной семядоли вытянутой формы — *щитка*, который отделяет зародыш от эндосперма и поглощает питательные вещества из него. Вместо второй семядоли, по мнению некоторых исследователей, закладывается эпибласт. Однако не все авторы разделяют эту точку зрения.

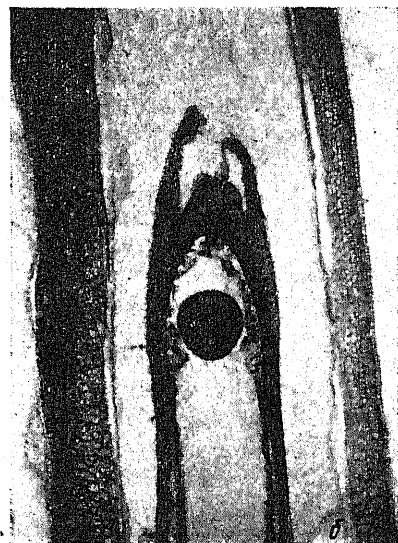


Рис. 106. Зародыши гречихи:

а — трехклеточный после двух митозов в зиготе (видна крупная базальная клетка и две более мелкие, образовавшиеся после митоза в апикальной клетке); *б* — многоклеточный до дифференциации; *в* — с двумя семядолями (микротомные препараты).

Конус нарастания побега, состоящий из почечки с зародышевыми листочками, окружен *колеоптиле*, а корешок с чехликом — *колеоризой*. У злаковых в зародыше могут закладываться еще дополнительные корешки.

Сходный зародыш с одной семядолей (как у пшеницы) развивается у ячменя, овса, ржи, кукурузы, но дифференциация его на органы и полное развитие протекают неодновременно. Так, у ячменя почти полная дифференциация заканчивается через 12 дней, а полное развитие зародыша — через 35 дней после опыления. У кукурузы через 12—13 дней формируются семядоля, точка роста и валик колеоптиле. Полное формирование зародыша и эндосперма заканчивается через 35—45 дней. Зародыш кукурузы в отличие от зародыша пшеницы не имеет эпибласта.

Не у всех видов растений зародыш дифференцирован на органы. Это характерно для сапрофитных, эпифитных и паразитных растений. Так, зародыш повилики не имеет корешка и семядолей.

У двудольных растений — зародыш с двумя семядолями. На препаратах однодольных (пшеница, кукуруза) и двудольных (клевер, гречиха, горох) видно, что различие в их структурах возникает с момента дифференциации зародыша, а первые этапы развития проэмбрио до образования круглого зародыша довольно сходны.

В ТСХА эмбриогенез подробно изучали у клевера и гречихи. У зародышей этих культур, как и у других двудольных, закладываются две семядоли и конус нарастания между ними. Зародыш имеет симметричную форму в отличие от однодольных.

У представителей бобовых — клевера и вики — подвесок хорошо развит. У клевера он многоклеточный, у вики состоит из четырех крупных многоядерных клеток. Такие подвески обеспечивают благоприятные условия для питания зародыша. У клевера эндосперм до дифференциации зародыша развивается нормально. В зрелых семенах у бобовых эндосперма нет или остаются следы, а запасные вещества откладываются в семядолях зародыша. Семя гречихи в зрелом состоянии имеет зародыш с двумя складчатыми семядолями, окруженными мучнистым эндоспермом.

У семян подсолнечника, сои, хлопчатника зародыш также состоит из двух семядолей, а эндосперм представлен всего одним слоем клеток. У льна зародыш имеет две мясистые семядоли и по своей массе несколько превышает эндосперм. В семядолях этих культур содержатся масло и алейроновые зерна.

Масса зародыша по отношению к массе целого зерна составляет, %: у пшеницы — около 3, у кукурузы — 8—15, у гороха и фасоли — 93—90.

ВЫРАЩИВАНИЕ ЗАРОДЫШЕЙ НА ИСКУССТВЕННОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ

При отдаленной гибридизации растений (межвидовой и межродовой) гибридные зародыши нередко гибнут в семенах. В этих случаях для получения гибридного потомства (F_1) можно воспользоваться методом культуры тканей (см. с. 55). Иногда удается получить потомство из таких семян, если выделить зародыши и поместить их на две недели в пробирки с ватой, увлажненной 10—15%-м раствором тростникового сахара. После этого зародыш промывают и переносят на увлажненную фильтровальную бумагу, где он прорастает, а затем высаживают в горшок. Такую методику проращивания зародышей на искусственной среде в свое время использовал Лайбах при отдаленной гибридизации льна.

Зародыши от скрещивания ячменя с рожью выращивали на искусственной среде Уайта. На той же среде выращивала гибридные зародыши от скрещивания твердой пшеницы ($2n=28$) с колосняком песчаным ($2n=56$) (*Triticum durum* × *Elymus arenarius*) Е. В. Ивановская.

Среда Уайта состоит из трех растворов. Раствор 1 готовят растворением в 250 мл дистиллированной воды 0,142 г $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0,074 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,081 г KNO_3 , 0,065 г KCl . Для приготовления раствора 2 растворяют 0,122 г KH_2PO_4 в 100 мл дистиллированной воды. Раствор 3 получают растворением 0,240 г $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ в 100 мл дистиллированной воды. Указанные растворы смешивают в объемах: 1—250 мл, 2—10 мл и 3—1 мл. В эту смесь добавляют 20 мл дрожжевого экстракта, приготовленного путем растворения 0,5 г сухих дрожжей в 100 мл воды, последующего кипячения и фильтрования. Смесь (растворы 1, 2, 3 + дрожжевой экстракт) переносят в колбу с горячим раствором из 5 г агара, 20 г сахарозы и 250 мл дистиллированной воды. Весь объем доводят до 1 л; pH среды устанавливают около 6,3, для этого добавляют две-три капли 0,2 н. раствора HCl и 1—2 мл KOH , индикатор — метилрот. Готовую среду наливают в пробирки по 3—4 мл в каждую, закрывают ватными пробками, помещают в автоклав и кипятят 20 мин при повышенном давлении.

Гибридные семена перед проращиванием погружают на 1—2 мин в раствор сулемы (1:1000), затем промывают кипяченой водой и помещают в чашки Петри на фильтровальную бумагу, увлажненную кипяченой водой. Чашки Петри перед употреблением протирают спиртом.

Семена вскрывают иглой под лупой и извлекают из них зародыш, который опускают в раствор сулемы на 1 мин, а затем переносят иглой в пробирку щитком вниз. Все инструменты и пробки обжигают на пламени. Тщательная стерилизация необ-

ходима для того, чтобы уберечь зародыш от плесени. Проращивают семена при 18—23 °С. Сеянцы с кусочком среды высаживают в горшки на 20—40-й день, когда побеги достигнут пробок. Их накрывают стаканом, а через неделю переносят на воздух сначала в тень, а потом в обычные условия.

Проращивание идет более успешно в том случае, если зародыш дифференцирован.

ОТКЛОНЕНИЯ ОТ НОРМАЛЬНОГО ХОДА РАЗВИТИЯ ЗАРОДЫША

Эмбриогенез нередко протекает с отклонениями от нормы при неблагоприятных внешних факторах, отдаленной гибридизации, полиплоидии и т. д.

Действие высокой температуры на диплоидную зиготу в момент ее первого митоза может привести к полиплоидии. Так были получены тетраплоиды у некоторых злаков. В 1938 г. А. Н. Лутков воздействием высокой температуры на зиготу получил тетраплоидную форму масличного льна.

При скрещивании пшеницы с элимусом развитие зародышей и эндосперма шло медленнее, чем при внутривидовом опылении. Двухклеточный зародыш появлялся не через день, а через три дня. Через десять дней он оставался еще без признаков дифференциации. В роде *Nicotiana* трудно удаются межвидовые скрещивания, происходит замедленное развитие и дегенерация зародыша.

Погодные условия также оказывают влияние на эмбриогенез. Так, высокие температуры воздуха, особенно в сочетании с низкой влажностью, заметно ускоряют развитие зародыша пшеницы, и, наоборот, низкие температуры в сочетании с относительно высокой влажностью замедляют его развитие. В этом случае зародыши уступают нормальным по размерам и степени дифференциации, особенно в первые две недели после оплодотворения. Из других внешних факторов, нарушающих эмбриогенез, следует отметить недостаток питания, а из генетических — несовместимость.

СЕМЯ И ПЛОД. ПОЛИЭМБРИОНИЯ

Семяпочка с развивающимся зародышем и эндоспермом (иногда без него) превращается в семя, а ее покровы (интегументы) и остатки нуцеллуса — в семенную кожуру, защищающую зародыш от действия внешних факторов. Чаше всего семя содержит один зародыш, но встречается *многозародышевость*, или *полиэмбриония*, когда внутри семени развивается несколько зародышей (рис. 107), причем образуются они или в результате нормального оплодотворения, или без него (путем апомиксиса). Многозародышевость известна примерно у 170 семейств. Основ-

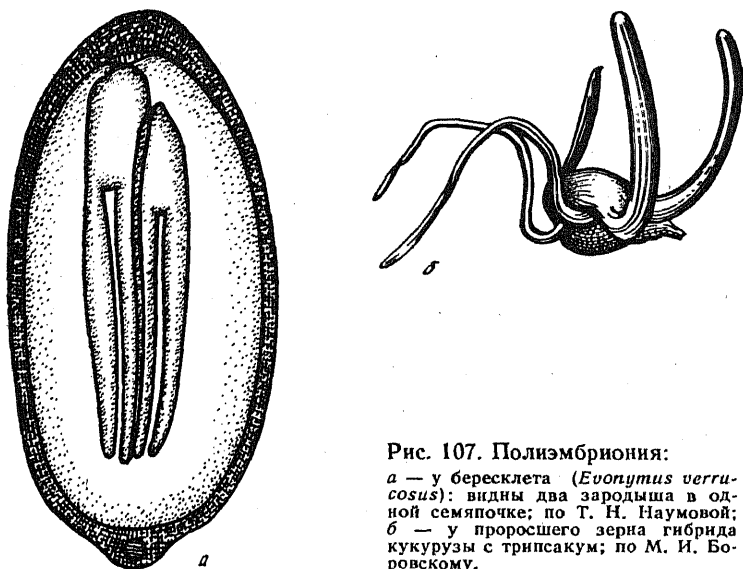


Рис. 107. Полиэмбриония:

a — у берескета (*Evogetus verrucosus*): видны два зародыша в одной семяпочке; по Т. Н. Наумовой; *б* — у проросшего зерна гибрида кукурузы с трипсакум; по М. И. Боровскому.

ной причиной этого явления считают апомиксис. В селекции многозародышевость можно использовать для увеличения коэффициента размножения семян и как маркерный признак при выявлении апомиктов.

В 1935 г. явление полиэмбрионии подробно изучала у клевера В. Ф. Федорчук. В одногнездной завязи у этой культуры нормально закладываются две семяпочки, и в каждой из них может развиваться один зародышевый мешок. При просмотре нескольких тысяч семяпочек лишь 40 имели дополнительные зародышевые мешки, но зародыши в них развивались редко. На этом основании был сделан вывод, что полиэмбриония у клевера — редкое явление. Внутри одного семени нормально развивается один зародыш, а в бобе — одно-два семени. По одному семени содержат плоды пшеницы, овса, ржи, ячменя, кукурузы, по два — плоды кофе, несколько семян в плодах гороха, фасоли.

Завязь, содержащая одно или несколько семян, превращается в плод. Плоды бывают сухие и сочные, причем и те и другие имеют плодовую оболочку — *перикарпий* (околоплодник), который образуется из стенки завязи. Необходимо различать понятия: семя и плод, семенная кожура и плодовая оболочка.

Рассмотрим строение *перикарпия* у плода пшеницы. Он состоит из эпидермиса, продольного слоя с длинными клетками (*эпикарпия*), поперечного слоя с толстостенными клетками (*мезокарпия*) и трубчатого слоя (*эндокарпия*). Толщина плодовой оболочки у озимой пшеницы около 44 мкм. Она составляет 3—5%, а иногда и более массы зерновки.

Семенная кожура пшеницы состоит из трех слоев: прозрачного, пигментного и гиалинового (греч. гиалос — стекло), или набухающего. Последний лежит на границе с алейроновым слоем эндосперма. Гиалиновый слой — бесструктурный, блестящий, не пропускает воду в эндосперм. Толщина семенной кожуры не более 10 мкм, т. е. в несколько раз меньше плодовой оболочки. Соответственно меньше ее масса — примерно около 1% общей массы зерновки.

Плод, называемый *зерновкой*, кроме пшеницы, имеют рожь, ячмень, овес, кукуруза, рис. Такой плод состоит из одного семени. У гороха, сои, фасоли, клевера, люцерны плод называется *бобом*. Он содержит несколько семян.

У гречихи плод — *трехгранный орешек*. Плодовая оболочка у него жесткая и состоит из эпидермиса, склеренхимного слоя, коричневатого-красного прозенхимного слоя и внутреннего эпидермиса. Пленчатость гречихи (масса плодовых оболочек в % массы плода) широко варьирует — от 16 до 30%. Этот показатель учитывают в селекции, так как он оказывает влияние на выход крупы.

У льна плод — *коробочка* с пятью гнездами. В каждом гнезде может развиваться по два семени, а в целой коробочке — десять семян. Хлопчатник также имеет плод — коробочку трех-, четырех- или пятигнездную. Семя у него покрыто двумя оболочками, одна из которых одревесневшая, а другая — пленчатая. На семени имеются волоски.

Плод свеклы — промежуточный между коробочкой и орешком. Под крышечкой его развивается одно семя. При созревании плоды срстаются и образуют соплодие. У односемянной свеклы каждый плод имеет одно семя.

Плод подсолнечника — *семянка*, имеющая кожистый перикарпий. Внутри семянки расположено семя, называемое в агрономической практике ядром. Плодовая оболочка семян подсолнечника состоит из эпидермиса, пробковой ткани (гиподермы), черного панцирного слоя (только у панцирных сортов), склеренхимы (толстостенных клеток) и паренхимы (слой белой ткани). Эти слои хорошо видны на поперечных срезах плодовой оболочки. Масса околоплодника (лузги) у масличного подсолнечника колеблется от 22 до 42%. Лузжистость подсолнечника обязательно учитывают в селекции, так как с этим признаком связан выход масла. Наличие панцирного слоя также имеет важное практическое значение: он предохраняет семянки от повреждения подсолнечной молью.

ПАРТЕНОКАРПИЯ

Существуют растения, у которых плоды развиваются даже в том случае, если семена не образуются, а семечки рано дегенерируют. Это явление получило название *партенокарпии*.

В этом случае формируются бессемянные плоды. Различают *стимулятивную* партенокарпию, если для образования плодов необходимо опыление цветков, и *автономную*, если опыления нет и оно не требуется.

Партенокарпия широко распространена у плодовых, цитрусовых и овощных растений (груша, яблоня, ананас, лимон, апельсин, огурец, тыква, томат и др.). Иногда партенокарпическое образование плодов стимулируют различными химическими веществами. Явление это имеет большое практическое значение, но природа его мало изучена.

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ПРИ СОЗДАНИИ НЕПОЛОВЫХ ГИБРИДОВ

Получение гибридов путем половой гибридизации у растений известно давно. В то же время только в последние годы стали известны факты получения соматических (парасексуальных) гибридов путем слияния протопластов разных видов и родов. Для этого сначала разрушают при помощи ферментного гидролиза клеточные стенки и получают протопласты, окруженные одной плазмалеммой. При слиянии протопластов получают гибрид. Описанный процесс позволяет осуществить отдаленную гибридизацию в тех случаях, когда невозможно провести скрещивание половым путем. Такие работы начаты в некоторых институтах нашей страны и за рубежом.

Легче сливаются меристематические и каллюсные клетки. Для слияния клеток необходимы индукторы, например нитрат натрия. Обозначают соматическую гибридизацию знаком +. На Украине впервые получены соматические гибриды от скрещивания арабидопсиса ($2n=10$) и турнепса ($2n=20$), за рубежом — картофеля и томатов. Осуществлено скрещивание культурного и дикого видов картофеля.

В качестве искусственной питательной среды используют среду Мурасиге — Скоуга или среду В₅. Осмотическое давление при культивировании клеток поддерживают при помощи глюкозы, сахарозы и других соединений. Плотность посева клеток 10^4 — 10^5 кл/мл, объем культуры 2,5—10 мл. Агглютинирование протопластов до слияния осуществляют полиэтиленгликолем или центрифугированием. Соматические гибриды представляют собой новый источник для получения исходного материала в селекции.

АПОМИКСИС

Кроме широко известных способов размножения сельскохозяйственных растений — полового (амфимиксис) и вегетативного (черенки, клубни, луковицы и т. д.), — встречается размножение

семенами, образование которых происходит без оплодотворения. Такой тип размножения называют *апомиксисом* (греч. апо — вдали, миксис — смешение), или *бесполосеменным размножением*. У растений-апомиктов развиваются внешне нормальные цветки, но мейоз нарушен или его нет совсем, что приводит к отсутствию спор в спорогенезе. Поэтому зародышевые мешки и пыльцевые зерна имеют различные отклонения от нормы. Если не происходит второе деление мейоза, яйцеклетка и другие элементы зародышевого мешка оказываются нередуцированными, т. е. диплоидными. Опыление рылец пылью у одних видов играет чисто стимулятивную роль, у других оно совсем необходимо. Зародыш апомиктов развивается при наличии эндосперма. Термин апомиксис предложил Винклер в 1908 г. Впервые это явление наблюдали Мурбек (1897, 1901) у манжетки и Юэль (1898, 1900) у бессмертника.

Основные типы

Партеногенез — образование зародыша семени из диплоидной (мейоза не было) или гаплоидной (мейоз был) яйцеклетки без оплодотворения спермием. Синергиды на препаратах целые, неповрежденные. На месте яйцеклетки образуется зародыш. При партеногенезе необходимо различать *гиногенез* и *андрогенез*. В обоих случаях наблюдается опыление и псевдогамия. В результате гиногенеза образуются особи, в генетическом отношении не отличающиеся от материнской формы, так как настоящего слияния женской гаметы со спермием не происходит. При андрогенезе особи в генетическом отношении могут быть сходны с отцовским сортом-опылителем, если по каким-то причинам ядра яйцеклетки гибнут, и развитие зародыша осуществляется только за счет мужских ядер.

При диплоидном партеногенезе пыльца чаще всего стерильна и мейоз отсутствует или протекает с аномалиями. Строение зародышевого мешка почти не отличается от обычного по внешнему виду, но встречаются виды растений, у которых есть отклонения. Нередко зарастают микропиле семяпочки, а зародыш и эндосперм образуются еще в бутоне до раскрытия цветка.

Подробно диплоидный партеногенез был описан в 1933 г. В. А. Поддубной-Арнольди у ястребинки. С ястребинкой, как известно, работал Мендель, который не обнаружил у нее тех генетических закономерностей, которые были им вскрыты в опытах с горохом. Более поздние исследования показали, что у этого вида совершенно иной тип размножения — *нередуцированный партеногенез*, при котором наблюдается наследование только материнского типа и из поколения в поколение передается партеногенетический способ размножения. Такой же тип размножения встречается у некоторых злаков, например у мятлика лугового.

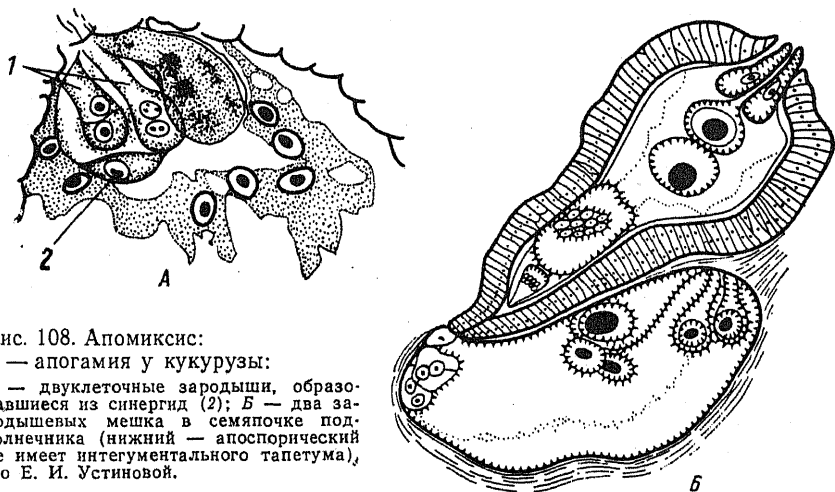


Рис. 108. Апомиксис:

А — апогамия у кукурузы:

1 — двуклеточные зародыши, образовавшиеся из синергид (2); Б — два зародышевых мешка в семязачатке подсолнечника (нижний — апоспорический не имеет интегументального тапетума), По Е. И. Устиновой.

При отдаленной гибридизации (пшеница, табак, картофель), действии высоких температур в момент оплодотворения (лен, кукуруза) в потомстве облученных растений, при опылении облученной пылью и т. д. отмечен *гаплоидный партеногенез*, причем чаще это гиногенез, т. е. возникают гаплоиды с признаками материнского растения. Андрогенные особи с отцовскими признаками также встречаются у растений, но этот процесс цитологически меньше изучен.

Апогамия — образование зародыша из неоплодотворенных синергид или антипод, которые могут быть диплоидными и гаплоидными. Она встречается реже, чем партеногенез, и описана у отдельных рас льна, кукурузы, риса, подсолнечника (рис. 108).

Аспория. При этом типе апомиксиса зародышевый мешок развивается не из мегаспороцита, а из соматических клеток. В таких случаях апоспорический зародышевый мешок нередко развивается как дополнительный к основному зародышевому мешку и располагается сбоку от него (чаще в халазальной части). Апоспорические зародышевые мешки обнаружены в семействе сложноцветные (астровые) — у различных видов ястребинки и подсолнечника. При аспории зародыши часто не развиваются или гибнут.

Адвентивная эмбриония — образование зародышей непосредственно из клеток нуцеллуса или интегументов семязачатка, т. е. вне зародышевого мешка. У citrusовых в пределах одной семязачатки таким путем формируется большое число зародышей рядом с основным — зиготическим. Возникшие семена могут прорасти несколькими проростками.

Эта классификация дополняется новыми типами, например гемигамией (греч. геми — полу, гамос — брак). Явление гемигамии открыл Батталья у рудбекии, назвав его семигамией. Он наблюдал независимые друг от друга деления мужского и женского ядер в цитоплазме яйцеклетки. Оказалось, что гемигамия встречается как у однодольных, так и у двудольных растений. В результате нее образуется двухъядерная зигота. В дальнейшем ядра делятся независимо. Развивающиеся зародыши имеют клетки с ядрами разного происхождения, т. е. химерные. Полагают, что это одна из форм апомиксиса (см. ниже), обнаружена она у хлопчатника.

У отдельных видов растений встречаются одновременно различные типы апомиксиса или наряду с половым размножением существует и апомиксис. Наблюдения за апомиктически размножающимися растениями (ястребинка, одуванчик, мятлик и др.) показывают, что они способны образовывать большое число семян независимо от погодных условий во время цветения. При этом получается константное в генетическом отношении потомство одного типа (при гиногенезе — материнского, при андрогенезе — отцовского), что имеет важное значение в селекции при закреплении в потомстве ценных признаков. Однако при этом необходимо учитывать ход мейоза у этих растений, а также то, что апомиксис не всегда передается по наследству.

Апомиксис позволяет закрепить гетерозис, но последнее требует разработки приемов, обеспечивающих регулярный (нередуцированный) апомиксис у тех видов, которые обладают наибольшей ценностью в отношении гетерозиса. Не менее ценен и тот факт, что мутации быстрее закрепляются в потомстве путем апомиксиса.

Методы выявления

Выявление апомиктов часто необходимо в процессе селекционной работы и при генетических исследованиях. Оно проводится по комплексу признаков: таксономических, морфологических, цитозембриологических, генетических и др. Необходимо учитывать широкое географическое распространение вида, редукцию цветка и дефектность пыльцы, наличие только женских цветков или обоеполых и женских, высокую семенную продуктивность независимо от погодных условий, образование семян в неопыленных цветках или в цветках, опыленных пылью другого вида, обработанных биологически активными веществами, механическими раздражителями, наличие полиэмбрионии и другие особенности, связанные с переходом растений на апомиксис.

При попытке получить гибрид в первом поколении проявляется *матроклинная наследственность*, при которой растения имеют признаки исходной материнской особи, так как скрещи-

вание не осуществилось. Если такое скрещивание происходит, то во втором поколении гибрида наблюдается явное отклонение от менделевского расщепления.

Анализ пыльцы апомиктов необходим для диагностики. При этом обнаруживается ее неоднородность по морфологии, повышенная стерильность. Иногда пыльца не образуется совсем.

Редукция отдельных частей цветка, дефектность пыльцы, слабое посещение цветков насекомыми нередко являются характерными признаками апомиктов. Ряд особенностей обнаруживается при изучении мейоза апомиктов: нарушение конъюгации хромосом, приводящее к образованию реституционных ядер с диплоидным или полиплоидным числом хромосом, образование диад вместо тетрад, замена мейоза митозом и др.

Изучение формирования зародышевого мешка выявляет также ряд отклонений от нормы: женский гаметофит образуется не из мегаспоры, а из соматической клетки нуцеллуса, в одной семязпочке формируется несколько зародышевых мешков, в одном зародышевом мешке — несколько яйцевых аппаратов, нарушена полярность зародышевого мешка и др. При изучении эмбриологии апомиктов часто трудно обнаружить признаки прониновения пыльцевых трубок в зародышевый мешок, наблюдается застывание микропиле, развитие двух зародышей в одном зародышевом мешке или одного — вне зародышевого мешка, а также образование его в бутоне или при сохранении синергид и др.

ПРИЛОЖЕНИЕ

СОМАТИЧЕСКОЕ ЧИСЛО ХРОМОСОМ У РАСТЕНИЙ

Мятликовые — *Poaceae* (= *Graminea*)*

Бамбук — <i>Sasa</i>	48
Волоснец сибирский — <i>Elymus sibiricus</i> L.	28, 42
Ежа сборная — <i>Dactylis glomerata</i> L.	14; 28; 42**
Житняк гребенчатый — <i>Agropyron cristatum</i> Gaertn.	14; 28; 42
Житняк сибирский — <i>Agropyron sibiricum</i> , Beauv.	28
Ковыль — <i>Stipa juncea</i> L.	44
Кострец безостый — <i>Bromus inermis</i> Leyss.	28; 42; 56
Кукуруза — <i>Zea mays</i> L.	20
Лисохвост луговой — <i>Alopecurus pratensis</i> L.	28; 42
Мятлик луговой — <i>Poa pratensis</i> L.	28; 56; 70
Овес песчаный — <i>Avena strigosa</i> Schreb.	14; 28
Овес посевной — <i>Avena sativa</i> L.	42
Овес византийский — <i>Avena byzantina</i> C. Koch	42
Овсяг обыкновенный — <i>Avena fatua</i> L.	42
Овсяг средиземноморский — <i>Avena sterilis</i> L.	42; 28
Овсяг южный — <i>Avena ludoviciana</i> Durand	42
Овсяница луговая — <i>Festuca pratensis</i> Huds.	14
Полевница белая — <i>Agrostis alba</i> L.	28; 42; 56
Просо обыкновенное — <i>Panicum miliaceum</i> L.	36
Пшеница однозернянка — <i>Triticum monococcum</i> L.	14
Пшеница твердая — <i>Triticum durum</i> Desf.	28
Пшеница персидская — <i>Triticum persicum</i> Vav.	28
Пшеница тургидум — <i>Triticum turgidum</i> L.	28
Пшеница полоникум — <i>Triticum polonicum</i> L.	28
Пшеница Тимофеева — <i>Triticum timopheevi</i> Znuk.	28
Пшеница двузернянка — <i>Triticum dicoccum</i> Schrank	28
Пшеница мягкая — <i>Triticum aestivum</i> L.	42
Пшеница спельта — <i>Triticum spelta</i> L.	42
Пшеница карликовая — <i>Triticum compactum</i> Host.	42
Пшеница круглозерная — <i>Triticum sphaerococcum</i> Perciv	42
Пшеница многолетняя — <i>Triticum agropyrotriticum</i> Cicin.	56
Пырей сизый — <i>Agropyron glaucum</i>	42
Пырей ползучий — <i>Agropyron repens</i> (L.) Beauv.	42
Пырей бескорневищный — <i>Agropyron tenerum</i> Vasey	28
Пырей удлиненный — <i>Agropyron elongatum</i> (Host) Beauv.	70
Райграс высокий — <i>Arrhenatherum elatius</i> M. et K.	14; 28; 42
Райграс многоукосный — <i>Lolium multiflorum</i> Lam.	14
Райграс пастбищный — <i>Lolium perenne</i> L.	14; 28
Рис посевной — <i>Oryza sativa</i> L.	24
Рожь культурная — <i>Secale cereale</i> L.	14
Рожь горная — <i>Secale montanum</i> Guss.	14

* Названия семейств даны по Эдинбургской номенклатуре (в скобках приведено распространенное название).

** Разные авторы приводят неодинаковые числа хромосом.

Сахарный тростник — <i>Saccharum officinarum</i> L.	80
Суданская трава — <i>Sorghum sudanense</i> (Piper) Stapf.	20
Тимофеевка луговая — <i>Phleum pratense</i> L.	14; 42
Чумиза — <i>Setaria italica</i> Beauv.	18
Эгилопс — <i>Aegilops caudata</i> L., <i>Ae. squarrosa</i> L., <i>Ae. speltoides</i> Tausch	14
Элимус песчаный — <i>Elymus arenarius</i> L.	56
Элимус гигантский — <i>Elimus giganteus</i> Vahl.	28; 56
Элимус мягкий — <i>Elimus mollis</i> Trin.	28
Ячмень двурядный — <i>Hordeum distichon</i> L.	14
Ячмень многорядный — <i>Hordeum vulgare</i> L.	14

Бобовые — *Fabaceae* (= *Leguminosae*)

Акация белая — <i>Robinia pseudoacacia</i> L.	20; 22
Акация желтая — <i>Caragana arborescens</i> Lam.	16
Арахис подземный — <i>Arachis hypogaea</i> L.	40
Бобы (русские, конские) — <i>Vicia faba</i> L.	12
Вика посевная — <i>Vicia sativa</i> L.	12
Вика крупноцветная — <i>Vicia amphicarpa</i> L.	10
Вика узколистная — <i>Vicia angustifolia</i> L.	12
Вика мохнатая — <i>Vicia villosa</i> Roth	14
Горох посевной — <i>Pisum sativum</i> L.	14
Горох полевой, или пелюшка — <i>Pisum arvense</i> L.	14
Клевер луговой — <i>Trifolium pratense</i> L.	14
Клевер пунцовый — <i>Trifolium incarnatum</i> L.	14
Клевер горный — <i>Trifolium montanum</i> L.	16
Клевер гибридный (розовый) — <i>Trifolium hybridum</i> L.	16
Клевер ползучий — <i>Trifolium repens</i> L.	32
Клевер средний — <i>Trifolium medium</i> L.	80; 96—98; 126
Люпин узколистный — <i>Lupinus angustifolius</i> L.	40
Люпин белый — <i>Lupinus albus</i> L.	48; 50
Люпин желтый — <i>Lupinus luteus</i> L.	52
Люпин многолистный — <i>Lupinus polyphyllus</i> Lindl.	48
Люпин гибридный — <i>Lupinus hybridus</i> Lem.	48
Люпин изменчивый — <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet	48
Люцерна посевная — <i>Medicago sativa</i> L.	32
Лядвенец рогатый — <i>Lotus corniculatus</i> L.	24
Нут культурный — <i>Cicer arietinum</i> L.	16
Соя культурная — <i>Glicine hispida</i> Maxim.	38; 40
Фасоль обыкновенная — <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	22
Чечевица культурная — <i>Lens, esculenta</i> Moench.	14
Чина посевная — <i>Lathyrus sativus</i> L.	14
Эспарцет песчаный — <i>Onobrychis arenaria</i> (Kit.) Ser.	14; 28

Льновые — *Linaceae*

Лен обыкновенный, долгунец — <i>Linum usitatissimum</i> L.	30; 32
--	--------

Мальвовые — *Malvaceae*

Канатник — <i>Abutilon avicennae</i> Gaertn.	42
Кенаф — <i>Hibiscus cannabinus</i> L.	36; 72
Мальва курчавая — <i>Malva crispa</i> L.	112
Хлопчатник обыкновенный — <i>Gossypium hirsutum</i> L.	52
Хлопчатник египетский — <i>Gossypium barbadense</i> L.	52
Хлопчатник слабовойлочный — <i>Gossypium tomentosum</i> Nutt ex Seem	52
Хлопчатник травянистый, гуза — <i>Gossypium herbaceum</i> L.	26
Хлопчатник древовидный — <i>Gossypium arboreum</i> L.	26

Чайные — *Theaceae*

Чай китайский — <i>Thea sinensis</i> L.	30
---	----

Капустные — *Brassicaceae* (= *Cruciferae*)

Арабидопсис — <i>Arabidopsis thaliana</i> L.	10
Брюква — <i>Brassica napus</i> L.	38
Горчица сизая — <i>Brassica juncea</i> (L.) Coss.	36
Горчица белая — <i>Sinapis alba</i> L.	24
Капуста кочанная — <i>Brassica oleracea</i> L.	18
Рапс — <i>Brassica napus</i> L., ssp. <i>oleifera</i> Metzg.	38
Редька посевная — <i>Raphanus sativus</i> L.	18
Турнепс, репа — <i>Brassica rapa</i> L.	20

Маревые — *Chenopodiaceae*

Свекла обыкновенная (сахарная) — <i>Beta vulgaris</i> L.	18
--	----

Крапивные — *Urticaceae*

Рами — <i>Boehmeria nivea</i> L.	28
----------------------------------	----

Гречишные — *Polygonaceae*

Горец Вейриха — <i>Polygonum weyrichii</i> F. Schmidt	20
Гречиха культурная — <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench	16
Гречиха татарская — <i>Fagopyrum tataricum</i> (L.) Gaertn.	16

Пасленовые — *Solanaceae*

Баклажан — <i>Solanum melongena</i> L.	24
Картофель культурный — <i>Solanum tuberosum</i> L.	48
Картофель гибберулосум — <i>Solanum gibberulosum</i> Juz. et Buk.	24
Картофель демиссум — <i>Solanum demissum</i> Lindl.	72
Махорка — <i>Nicotiana rustica</i> L.	48
Табак — <i>Nicotiana tabacum</i> L.	48
Томат — <i>Lycopersicum esculentum</i> Mill.	24

Кунжутные — *Pedaliaceae*

Кунжут индийский — <i>Sesamum indicum</i> L.	26
--	----

Астровые — *Asteraceae* (= *Compositae*)

Астра итальянская — <i>Aster amellus</i> L.	18; 36; 54; 66
Астра китайская — <i>Callistephus chinensis</i> Nees	18; 36
Гаглопипус — <i>Haplopappus gracilis</i> (Nutt.) A. Gray	4
Земляная груша (топинамбур) — <i>Helianthus tuberosus</i> L.	102
Левзея сафлоровидная — <i>Rhaponticum carthamoides</i> (Willd.) M. Illjin	24
Подсолнечник культурный — <i>Helianthus annuus</i> L.	34
Сафлор — <i>Carthamus tinctorius</i> L.	24
Сильфия пронзеннолистная — <i>Silphium perfoliatum</i> L.	14; 16
Скерда зеленая, крепис — <i>Crepis capillaris</i> (L.) Wallr.	6
Хризантема венковидная — <i>Chrysanthemum coronarium</i> L.	18; 36

Лилейные — *Liliaceae*

Безвременник осенний — <i>Colchicum autumnale</i> L.	24; 38; 42
Лилия мартагон — <i>Lilium martagon</i> L.	24
Лук-батун — <i>Allium fistulosum</i> L.	16
Лук репчатый — <i>Allium cepa</i> L.	16
Тюльпан — <i>Tulipa mogoltavica</i> M. Pop. et Vved.	24
Чеснок посевной — <i>Allium sativum</i> L.	16

Крыжовниковые — *Grossulariaceae*

Крыжовник — <i>Ribes grossularia</i> L.	16
Смородина обыкновенная — <i>Ribes vulgare</i> Lam.	16

Розаные — *Rosaceae*

Абрикос обыкновенный — <i>Armeniaca vulgaris</i> Lam.	16
Вишня обыкновенная — <i>Cerasus vulgaris</i> Mill.	32
Груша обыкновенная — <i>Pyrus communis</i> L.	34
Земляника лесная — <i>Fragaria vesca</i> L.	14
Земляника мускатная (клубника) — <i>Fragaria moschata</i> Duch.	42
Земляника садовая — <i>Fragaria grandiflora</i> Ehrh.	56
Малина обыкновенная — <i>Rubus idaeus</i> L.	14
Персик обыкновенный — <i>Persica vulgaris</i> Mill.	16
Роза морщинистая — <i>Rosa rugosa</i> Thunb.	14
Роза столитная — <i>Rosa centifolia</i> L.	28
Роза белая — <i>Rosa alba</i> L.	28; 42
Рябина обыкновенная — <i>Sorbus aucuparia</i> L.	34
Слива домашняя — <i>Prunus domestica</i> L.	48
Черешня — <i>Cerasus avium</i> Moench	16
Яблоня домашняя (культурная) — <i>Malus domestica</i> Borkh	34; 51

Рутые — *Rutaceae*

Апельсин настоящий — <i>Citrus aurantifolia</i> Swingle	18; 27
Лимон — <i>Citrus limon</i> (L.) Burm	18; 36
Мандарин — <i>Citrus reticulata</i> Blanco	18; 27; 36

Виноградные — *Vitaceae*

Виноград культурный — <i>Vitis vinifera</i> L.	38; 76
--	--------

Сельдерейные — *Apiaceae* (= *Umbelliferae*)

Анис — <i>Pimpinella anisum</i> L.	18; 20
Борщевик — <i>Heracleum sosnowskyi</i> Mand.	22
Кориандр — <i>Coriandrum sativum</i> L.	22
Морковь — <i>Daucus carota</i> L.	18
Петрушка — <i>Petroselinum segetum</i> (L.) Koch	18
Сельдерей — <i>Apium graveolens</i> L.	22
Тмин — <i>Carum carvi</i> L.	20; 22
Укроп — <i>Anethum graveolens</i> L.	22

Тутые — *Moraceae*

Инжир — <i>Ficus carica</i> L.	26
Конопля культурная — <i>Cannabis sativa</i> L.	20
Тута белая (шелковица) — <i>Morus alba</i> L.	28
Хмель — <i>Humulus lupulus</i> L.	20

Гранатовые — *Punicaceae*

Гранат — <i>Punica granatum</i> L.	16
------------------------------------	----

Ореховые — *Juglandaceae*

Орех грецкий — <i>Juglans regia</i> L.	32
--	----

Мареновые — *Rubiaceae*

Кофе арабийский — <i>Coffea arabica</i> L.	22; 44
--	--------

Тыквенные — *Cucurbitaceae*

Арбуз столовый — <i>Citrullus vulgaris</i> Schrad.	22
Дыня мелкоплодная — <i>Melo microcarpus</i> Pang	24
Огурец — <i>Cucumis sativus</i> L.	14
Тыква гигантская — <i>Cucurbita maxima</i> Duch.	40

Бромелиевые — *Bromeliaceae*

Ананас настоящий — <i>Ananas comosus</i> (L.) Mett	50; 75; 100
--	-------------

Банановые — *Musaceae*

Банан — <i>Musa</i> L.	20; 22; 33
------------------------	------------

- Абрамова З. В., Карлинский О. А. Практикум по генетике. — Л.: Колос, 1979.
- Алексеева Е. С., Паушева З. П. Генетика, селекция и семеноводство гречихи. — Киев: Вища школа, 1988.
- Атабекова А. И., Устинова Е. И. Цитология растений. — М.: Агропромиздат, 1987.
- Банникова В. П., Хведынич О. А. Основы эмбриологии растений. — Киев: Наукова думка, 1982.
- Биотехнология/Под ред. А. А. Баева. — М.: Наука, 1984.
- Босто К., Самнер Э. Хромосома эукариотической клетки. — М.: Мир, 1981.
- Вермель Е. М. История учения о клетке. — М.: Наука, 1970.
- Генетика, биохимия и цитология мейоза/Под ред. Ю. Ф. Богданова. — М.: Наука, 1982.
- Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Клеточная инженерия растений. — Киев: Наукова думка, 1984.
- Гостинский С. А. и др. Практикум по цитогенетике. — М.: Изд-во МГУ, 1974.
- Гуляев Г. В., Мальченко В. В. Словарь терминов по генетике, цитологии, селекции, семеноводству и семеноведению. — М.: Россельхозиздат, 1983.
- Дарлингтон С. Д., Лакур Л. Ф. Хромосомы. Методы работы. — М.: Атомиздат, 1980.
- Жученко А. А., Король А. Б. Рекомбинация в эволюции и селекции. — М.: Наука, 1985.
- Заварзин А. А., Харазова А. Д. Основы общей цитологии. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1982.
- Ивановская Е. В. Цитэмбриологическое исследование дифференцировки клеток растений. — М.: Изд-во МГУ, 1983.
- Катаева Н., Бутенко Р. Клональное микроразмножение растений. — М.: Наука, 1983.
- Клеточный цикл растений/Под ред. И. Н. Гудкова. — Киев: Наукова думка, 1983.
- Культура клеток растений/Под ред. Р. Г. Бутенко. — М.: Наука, 1981.
- Левитский Г. А. Цитогенетика. — М.: Наука, 1976.
- Левитский Г. А. Цитология растений. — М.: Наука, 1976.
- Макаров Б. В., Сафронов В. В. Цитогенетические методы анализа хромосом. — М.: Наука, 1978.
- Методические указания по технике анатомических исследований культурных растений/Под ред. В. Ф. Дорофеева. — Л.: ВИР, 1981.
- Методические указания по цитологической и цитэмбриологической технике (для исследования культурных растений)/Под ред. Л. И. Орел. — Л.: ВИР, 1982.
- Мошковиц А. И. Добавочные хромосомы покрытосеменных растений. — Кишинев: Штиинца, 1979.

- Навашин М. С. Проблемы кариологии и цитогенетики в исследованиях рода *Crepis*. — М.: Наука, 1985.
- Ницше В., Венцель Г. Гаплоиды в селекции растений. — М.: Колос, 1980.
- Нокс Р. Б. Биология пыльцы. — М.: Агропромиздат, 1985.
- Петров Д. Ф. Цитологические основы наследственности. — М.: Колос, 1973.
- Поддубная-Арнольди В. А. Цитоэмбриология покрытосеменных растений. — М.: Наука, 1976.
- Покровский А. А., Тутельян В. А. Лизосомы. — М.: Наука, 1976.
- Решетников В. Н. Пластиды и клеточные ядра высших растений: биохимические аспекты/Под ред. А. С. Вечера. — Минск: Наука и техника, 1982.
- Савченко М. И. Морфология семян покрытосеменных растений. — Л.: Наука, 1973.
- Саламатова Т. С. Физиология растительной клетки. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1983.
- Свенсон К., Уэбстер П. Клетка. — М.: Мир, 1980.
- Соколов И. Д., Романов И. Д., Аминов Н. Х. Цитология эндосперма цветковых растений. — Киев—Донецк: Вища школа, 1980.
- Соловьева Л. В. Практикум по цитологии плодовых растений. Методическое пособие. — М.: Изд-во МГУ, 1982.
- Сравнительная эмбриология цветковых растений/Под ред. С. Яковлева. — Л.: Наука, т. 1, 1981; т. 2, 1983; т. 3, 1986.
- Структура и функции биологических мембран растений//Под ред. Р. К. Саляева, В. К. Войникова. — Новосибирск: Наука, 1985.
- Турков В. Д. и др. Хромосомный анализ растений. — М.: Изд-во УДН, 1982.
- Цитолого-эмбриологические и генетико-биохимические основы опыления и оплодотворения растений/Под ред. В. П. Банниковой. — Киев: Наукова думка, 1982.
- Цицлин Н. В. Отдаленная гибридизация растений. — М.: Наука, 1978.
- Ченцов Ю. С. Общая цитология. — М.: Изд-во МГУ, 1984.
- Щепанский Г. В. Техника фотографии. — М.: Искусство, 1987.
- Эзау К. Анатомия семенных растений. Т. 1—2. — М.: Мир, 1980.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	3
ОБОРУДОВАНИЕ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В ЦИТОЛОГИИ	5
Микроскоп и основные приемы работы с ним	5
Общая характеристика	5
Устройство микроскопа	5
Виды микроскопов, используемых при изучении биологических объектов	13
Вспомогательные принадлежности к микроскопам	18
Работа с микроскопом	20
Общие замечания	20
Установка освещения	21
Центрирование	24
Фокусирование	25
Выбор светофильтров	26
Работа с рисовальным аппаратом	28
Измерение объектов под микроскопом	30
Подсчет клеток в счетных камерах	33
Микрофотография	34
Методы наблюдения при помощи микроскопа	38
Метод светлого поля	39
Метод темного поля	39
Метод фазового контраста и интерференционная микроскопия	41
Метод наблюдения в поляризованном свете	45
Методы флуоресцентной и ультрафиолетовой микроскопии	45
Метод инфракрасной микроскопии	49
Электронная микроскопия	50
Способы подготовки к исследованию и методы изучения клетки	53
Постоянные микротомные препараты	56
Подбор объектов для исследования и подготовка их к фиксации	58
Специальная обработка объектов перед фиксацией	60
Фиксаторы, их состав и использование	61
Фиксация	66
Промывание и обезвоживание	69
Пропитывание промежуточной жидкостью и парафином	72
Приготовление парафиновых блоков	75
Получение микротомных срезов	77
Наклейка парафиновых срезов на предметные стекла	81
Удаление парафина и окрашивание срезов	83
Монтирование препаратов	95
Постоянные глицириножелатиновые препараты	95
Временные препараты. Перевод их в постоянные	97

Фиксация, хранение и мацерация объектов	97
Окрашивание препаратов	98
Ускоренный метод приготовления давленных препаратов	102
Приготовление препаратов из стеблевой меристемы	102
Приготовление препаратов из молодых листочков	103
Перевод временных препаратов в постоянные	103
Гистохимические методы. Качественный анализ	105
Углеводы	106
Белки	108
Аминокислоты	109
Жиры	109
Нуклеиновые кислоты	110
Ферменты	110
Физиологически активные вещества	111
Вещества вторичного происхождения	112
Количественные цитохимические методы	112
Цитофотометрия	113
Цитоинтерферометрия	117
Техника безопасности во время практических работ	118
ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ ПО ИЗУЧЕНИЮ КЛЕТКИ	119
Строение клетки высших растений	119
Поверхностный аппарат	120
Цитоплазма	121
Интерфазное ядро	129
Строение клетки грибов	133
Общая характеристика	133
Методы приготовления препаратов	134
Особенности строения бактерий и вирусов	135
Митоз	137
Митотический цикл	138
Митотическая активность ткани и определение продолжительности отдельных периодов и фаз митотического цикла	142
Эндомитоз, амитоз, К-митоз	145
Первые митозы	147
Парасинхронизация клеток	147
Хромосомы	148
Морфология	148
Хромосомы на протяжении клеточного цикла. Кариотип, кариограмма и идиограмма. Числа хромосом	148
Политенные хромосомы и их функциональная морфология	156
Приготовление ацетокарминовых препаратов для изучения гигантских хромосом из слюнных желез дрозофилы	158
Подсчет хромосом	160
Идентификация хромосом	161
Методика исследования полового хроматина	164
Методы приготовления давленных препаратов для изучения хромосом с учетом особенностей сельскохозяйственных культур	165
Мутации	170
Методы выявления	170
Типы перестроек	171
Хромосомный мутагенез и методы изучения перестроек хромосом	178
Типы геномных мутаций	183
Выявление полиплоидных растений цитологическими методами	185
Методы выявления гаплоидов	187
Геномный анализ аллополиплоидов	188
Мейоз и гаметогенез	189

Мейоз	189
Типы мейоза	190
Фазы мейоза	193
Микроспорогенез	197
Изучение микроспорогенеза в пыльниках на давленных препаратах	202
Пахитенный анализ	203
Развитие мужского гаметофита (микрогаметогенез)	205
Подсчет хромосом в пыльцевых зернах во время гаплоидного митоза	206
Приготовление глицериножелатиновых препаратов для измерения и изучения структуры пыльцевых зерен	207
Фертильность пыльцевых зерен	208
Стерильность пыльцевых зерен	211
Выявление жизнеспособности пыльцевых зерен	212
Выявление нередуцированных пыльцевых зерен	215
Мегаспорогенез	215
Развитие зародышевого мешка (макрогаметогенез)	219
Методика определения фертильных и стерильных семязпочек с использованием флуоресцентной микроскопии	223
Изготовление тотальных препаратов семязпочек и зародышевых мешков	224
Нарушения нормального хода мейоза и гаметогенеза	225
Мейоз и гаметогенез у отдаленных гибридов и амфидиплоидов	230
Анализ нарушений в мейозе у автополиплоидов	234
Половое размножение растений	237
Типы половых механизмов. Половые хромосомы. Системы полового размножения	237
Опыление и прорастание пыльцевых зерен	238
Несовместимость у растений	239
Двойное оплодотворение (амфимиксис)	241
Методы приготовления препаратов и наблюдения пыльцевых трубок	245
Методика выявления пыльцевых трубок флуоресцентным методом	246
Селективное оплодотворение	247
Эндоспермогенез	247
Ксении	250
Эмбриогенез	251
Выращивание зародышей на искусственной питательной среде	254
Отклонения от нормального хода развития зародыша	255
Семя и плод. Полиэмбриония	255
Партенокарпия	257
Клеточная инженерия при создании неполовых гибридов	258
Апомиксис	258
Основные типы	259
Методы выявления	261
<i>Приложение</i>	263
<i>Литература</i>	267

Паушева Зоя Петровна
ПРАКТИКУМ ПО ЦИТОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

Зав. редакцией *И. П. Незговорова*
Художественный редактор *Б. К. Дормидонтов*
Технический редактор *В. А. Боброва*
Корректор *М. Ф. Казакова*

ИБ № 4798

Сдано в набор 05.05.88. Подписано к печати 12.07.88. Формат 60×88¹/₈.
Бумага кн.-журн. Гарнитура Литературная. Печать офсетная. Усл. печ.
л. 16,66. Усл. кр.-отт. 16,66. Уч.-изд. л. 17,23. Изд. № 530. Тираж 11 000 экз.
Заказ № 271. Цена 90 коп.

Ордена Трудового Красного Знамени ВО «Агропромиздат», 107807, ГСП-6,
Москва, Б-78, ул. Садовая-Спасская, 18.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома при Государственном
комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.
Москва, 113105, Нагатинская, 1.